

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Liis Pärnpuu

**AlkB järjestuste mitmekesisuse võrdlemine Läänemere 2008. ja 2009. aasta  
*alkB* klooniraamatukogude põhjal**

Bakalaureusetöö

Juhendaja Teadur Signe Viggor PhD

TARTU 2013

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1. Läänemere omapära ja olulisus .....	6
1.2. Toornafta koostis .....	7
1.3. <i>n</i> -alkaanide aeroobse lagundamise rajad .....	7
1.4. Alkaani hüdroksülaasid/oksügenaasid .....	10
1.4.1. Metaani monooksügenaasid .....	12
1.4.2. Propaani ja butaani monooksügenaasid .....	12
1.4.3. Membraaniseoselised alkaani hüdroksülaasid, AlkB valguperekond .....	13
1.4.4. Tsütokroom P450 valguperekonna ensüümid .....	14
1.4.5. Ensüümid pikkade alkaani ahelate lagundamiseks .....	15
1.5. Naftasaadusi lagundavad mikroorganismid .....	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	18
2.1. Töö eesmärgid .....	18
2.2. Materjal ja meetodika .....	18
2.2.1. Veeproovide võtmine Läänemerest ja koosluse DNA eraldamine .....	18
2.2.2. <i>AlkB</i> geenifragmendi amplifitseerimine .....	19
2.2.3. Geelelektroforees .....	20
2.2.4. <i>AlkB</i> klooniraamatukogu koostamine .....	20
2.2.5. Denatureeriva gradiendiga geelelektroforees (DGGE) .....	21
2.2.6. Sekveneerimine .....	22
2.2.7. Sekveneeritud <i>alkB</i> järjestuste analüüs .....	22
2.3. Tulemused ja arutelu .....	23
2.3.1. 2008. ja 2009. aasta <i>alkB</i> klooniraamatukogude koostamine .....	23
2.3.2. <i>AlkB</i> klooniraamatukogude mitmekesisuse analüüs .....	25
2.3.3. AlkB järjestuste fülogeneetiline analüüs .....	27
2.3.3.1. Domineerivate kloonirühmade ennustatavate AlkB järjestuste analüüs .....	31
2.3.3.2. Grampositiivsete bakterite ennustatavate AlkB järjestustele sarnaste <i>alkB</i> kloonirühmade analüüs .....	32
2.3.3.3. Teiste gramnegatiivsete bakterite ennustatavate AlkB järjestustele sarnaste <i>alkB</i> kloonirühmade analüüs .....	34

KOKKUVÕTE .....	37
SUMMARY .....	39
KASUTATUD KIRJANDUS .....	41
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	52
Lisa 1 .....	53
Lisa 2 .....	54
LIHTLITSENTS.....	56

## KASUTATUD LÜHENDID

aa – aminohape (*amino acid*)

AlkB – membraaniseoseline alkaani hüdroksülaas

bp – aluspaar (*base pair*)

BRENDA – ensüümide funktsionaalse informatsiooni andmebaas (*the comprehensive enzyme information system*)

CELMS – keskkonna ja laboratoorsete mikroobitüvede kogu (*collection of environmental and laboratory microbial strains*)

DGGE – denatureeriva gradiendiga geelelektroforees

GN – gramnegatiivne

GP - grampositiivne

HELCOM – Helsingi Komisjon

NADH – nikotiinamiid adeniin dinukleotiin

PAH – polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

pBMO – membraaniseoseline butaani monooksügenaas

pMMO – membraaniseoseline metaani monooksügenaas

sBMO – tsütoplasmaatiline butaani monooksügenaas

sMMO – tsütoplasmaatiline metaani monooksügenaas

PRM – propaani monooksügenaas

Trp55 – trüptofaan 55

# SISSEJUHATUS

Läänemeri on maailmas suuruselt teine riimveeline veekogu, mida peetakse üheks maailma saastatuimaks veeökosüsteemiks (Dybern ja Fonselius, 1981) ning mille peamiseks ohuks on toornaftareostus. Toornafta koosneb mitmetest orgaanilistest ühenditest, nagu alkaanid, tsükloalkanid, aromaatsed ühendid ja asfalteenid (Hyne, 2001; Teräväinen *et al.*, 2007). Juba umbes sajand tagasi oli Söhngen võimeline eraldama baktereid, kellel oli võime lagundada metaani (Söhngen, 1906) või pikema ahelaga alkaane (Söhngen, 1913). Hiljuti on hakatud sajanditaguseid omandatud teadmisi mikroorganismide alkaanide lagundamisvõimest kasutama selleks, et uurida võimalusi, kuidas saaks kasutada baktereid keskkonnareostuse kõrvaldamiseks. Bakteritel on lagundamiseks vastavad ensüümid, mida nimetatakse alkaani hüdroksülaasideks, mis sõltuvalt lagundatava alkaani ahela pikkusele jagatakse erinevatesse rühmadesse, nagu metaani monooksügenaasid, tsütokroom P450 ensüümid, membraaniseoselised alkaani hüdroksülaasid ja pika ahelaga alkaanide lagundamist läbiviivad ensüümid (van Beilen ja Funhoff, 2007). Kõige levinumad ja enim uuritud nendest ensüümidest on membraaniseoselised alkaani hüdroksülaasid (AlkB), mida kodeerib geen *alkB*.

Läänemere mikroobikooslusi on seni kirjeldatud peamiselt 16S rRNA-d kodeeriva geeni järgi tehtud klooniraamatukogude analüüside põhjal (Hagström *et al.*, 2000; Edlund ja Jansson, 2008; Riemann *et al.*, 2008; Koskinen *et al.*, 2011). Selleks, et uurida Läänemeres elutsevate mikroobide võimet toornafta koostises olevate orgaaniliste ühendite lagundamisel, peaks analüüsima sealsete alkaani hüdroksülaasi geenide mitmekesisust. Hea võimalus selleks on *alkB* geenil põhineva klooniraamatukogu koostamine ning seega on antud bakalaureusetöö põhieesmärkideks:

- iseloomustada *alkB* klooniraamatukogu põhjal 2009. aastal võetud nelja Läänemere veeproovipunkti mitmekesisust;
- võrrelda 2008. ja 2009. aastal võetud veeproovipunktide *alkB* klooniraamatukogusid.

Tänan Signe Viggor'it juhendamise ja koostöö eest ning laborikaaslast abistamise ja nõuandmise eest.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Läänemere omapära ja olulisus

Läänemeri on suuruselt teine riimveeline veekogu maailmas. See omadus ja ka geograafiline paiknemine ning hüdro-morfoloogilised tingimused on põhjusteks, miks ta on nii mere- kui ka mageveeliikide reservuaariks (Hölldorf *et al.*, 1981). Läänemeri on peaaegu suletud meri, olles maailma ookeanidega ühenduses ainult kitsaste ja madalate Taani väinade (Sund, Suur-Belt ja Väike-Belt) ning Kattegat kaudu, mistõttu on veevahetus Põhjameriga piiratud (HELCOM, 2009). Samal ajal lisandub Läänemerre pidevalt magevett rohkem kui 250 jõest ning ka sademete kaudu. See põhjustab ookeani soolsusega (ca 35 ‰) võrreldes madalamat soolsust (6-8 ‰). Riimvee väljavool pinnakihi ja soolase vee sissevool pinnaaluses veekihi põhjustab soolasema põhjavee ning magedama pinnavee kihistumise. Lisaks esineb (eriti suvel ja varasügisel) kihistumine ka külmema põhjavee ja soojema pinnavee vahel. Kihistumine ei lase põhjaveel hapnikurikka pinnaveega seguneda, mis loob sügavamates kihtides hapnikuvabad tingimused (Ruskule *et al.*, 2009). Just neil põhjustel on igasugusel reostusel Läänemere ökosüsteemile katastroofiline mõju.

Tänapäeval kuulub Läänemeri nii tiheda laevaliikluse kui ka rannalähedaste valgate elanikonna arvu poolest maailma kõige aktiivsema tegevusega merede hulka (Ruskule *et al.*, 2009). Läänemere ranniku ja avamere alad on kasutusel mitmetes eri valdkondades, nagu tööstus, põllumajandus ja akvakultuur, nafta- ja tuuleenergia tootmine, laevandus, kaubanduslik kalapüük, sadamate arendus- ja hooldustegevus (sh süvendamis- ja kaadamistegevus) või turismindus ja puhkemajandus (Lehtonen ja Schiedek, 2006).

Läänemerd peetakse üheks kõige saastatumaks veekoguks maailmas (Dybern ja Fonselius, 1981) ning otsitakse ja arendatakse viise, mis aitaksid olukorda parandada. Läänemere ökosüsteemi peamiseks ohuks (eutrofeerumise kõrval) peetakse toornaftat ja õlireostust, mis on tingitud sellest, et õli kasutatakse, transporditakse ja hoiustatakse selles regioonis palju. Tänapäeval transporditakse Läänemerel umbes 170 miljonit tonni õli aastas, kuid aastaks 2015 ennustatakse selle koguse suurenemist 40% võrra (HELCOM, 2009). Samas on väiksemaid naftamaardlaid leitud ka Läänemerest (Läti-Leedu piiri lähedalt) ning 2004. aastal alustas Venemaa nafta puurimist Läänemerel, Kaliningradi piirkonnas. Kuigi Läänemere naftakogused on suhteliselt väikesed, võib nende keskkonnamõju olla märkimisväärne, kui

pidada silmas Läänemere ökosüsteemi tundlikkust ja meres asuvate puurtornidega kaasnevaid ohte (Kloff ja Wicks, 2004).

Läänemere kaitsmise ja hoidmise olulisusest saadi aru juba ca 40 aastat tagasi kui 1974. aastal allkirjastasid Läänemere riigid Helsingis ühiselt „Läänemere piirkonna merekeskkonna kaitse konventsiooni”, mida tuntakse Helsingi konventsioonina. Kuus aastat hiljem loodi konventsiooni osapoolte vahel organisatsioon, mida nimetatakse Läänemere merekeskkonna kaitse komisjoniks (HELCOM), eesmärgiga vähendada reostust. 2007. aastal võttis HELCOM vastu Läänemere tegevuskava, milles on loetletud tegevused ja eesmärgid eutrofeerumise ohjeldamiseks, ohtlike ainete reostuskoormuse vähendamiseks, mere bioloogilise mitmekesisuse parandamiseks ja mereliste tegevuste keskkonnamõju vähendamiseks. (Ruskule *et al.*, 2009). Seega peetakse oluliseks Läänemere korrashoidu ja mitmekesisuse säilitamist ka poliitilisel tasemel.

## **1.2. Toornafta koostis**

Toornaftareostus maailma meredes, ookeanides ja rannikutel ohustab planeedi Maa jätkusuutlikust (Halpern *et al.*, 2008). Toornafta on kompleksne segu tuhandetest orgaanilistest ühenditest (Hyne, 2001). Toornafta koosneb 90% ulatuses süsivesinikest, millest keskmiselt moodustavad 30% alkaanid, 49% tsükloalkaanid, 15% aromaatsed ühendid ja 6% asfalteenid (Hyne, 2001; Teräväinen *et al.*, 2007). Ülejäänud 10% moodustavad N, O ja S heteroaatomeid ja metalliaatomeid sisaldavad polaarsed ühendid (Teräväinen *et al.*, 2007). Erinevatest leiukohtadest pärinevate toornafta keemiliste ja füüsikaliste omaduste varieeruvus mõjutab oluliselt ka nende biodegradeeritavust keskkonnas (Head *et al.*, 2006). Merekeskkond on eriti tundlik toornaftareostuse suhtes ning seega on oluline teada, kuidas mikroorganismid lagundavad süsivesinikke.

## **1.3. *n*-alkaanide aeroobse lagundamise rajad**

Alkaanid on keemiliselt ja biokeemiliselt suhteliselt stabiilsed ühendid. Ühest küljest on toornafta koostises olevad süsivesinikud inimkonnale oluliseks energiaallikaks kui ka orgaaniliste ainete allikaks (põhiorgaanilise sünteesi lähteainena). Samas teisest küljest on lühikese ahelaga alkaanid käsitletavad kasvuhooonegaasidena ning sõltumata süsinikuahela pikkusest keskkonnale ohtlikud ja toksilised. Miljoneid aastaid keskkonnas esinenud alkaanid

on viinud mikroobid evolutsioonini, mille tulemusena on nad võimelised süsivesinikke aktiveerima ja kasutama peamise või ainukese süsiniku- ja energiaallikana (Prince *et al.*, 2010). Aeroobset alkaanide lagundamise võimet on kirjeldatud erinevatel mikroorganismidel: bakteritel, seentel ja pärmseentel (van Beilen *et al.*, 2003). Mikroobid võivad alkaane aktiveerida aeroobselt või anaeroobselt, sõltuvalt sellest, milline keemiline element on elektroni aktseptoriks. Aeroobsetes tingimustes on elektroni aktseptoriks hapnik ja anaeroobsetes tingimustes kas sulfaat (Edwards *et al.*, 1992), nitraat (Burland ja Edwards, 1999),  $\text{Fe}^{3+}$  (Lovely *et al.*, 1994; Lovely *et al.*, 1996) või süsihappegaas (Vogel ja Grbi'c-Gali'c, 1986).

Aeroobset alkaanide lagundamist algatavad alkaani oksügenaasid (EC 1.14.15.3) - ensüümid, mis lisavad hapnikuaatomeid alkaanidele. Alkaani oksügenaasi nimetatakse ka alkaani hüdroksülaasiks, alkaani 1-hüdroksülaasiks, omega-hüdroksülaasiks, rasvhappe omega-hüdroksülaasiks, alkaani monooksügenaasiks ja 1-hüdroksülaasiks (BRENDA, 2013). Mikroorganismides on kirjeldatud nelja *n*-alkaanide aeroobse lagundamise rada (Joonis 1):

1. terminaalne rada;
2. biterminaalne rada;
3. subterminaalne rada;
4. Finnerty rada (Ji *et al.*, 2013).

Üldiselt on nende radade ensüümid mikroobides erinevad, kuigi lagundamise esimese etapi ensüümid kuuluvad alkaani hüdroksülaaside hulka (Joonis 1). Terminaalne oksüdatsioon algab *n*-alkaanide terminaalse metüülrühma oksüdeerimisega, mille käigus tekib primaarne alkohol, mida edasi oksüdeerivad alkoholi ja aldehüüdi dehüdrogenaasid. Nende reaktsioonide tulemusel tekkinud rasvhapped sisenevad  $\beta$ -oksüdatsiooni ratta, kus moodustub rasvhappeatsetüül-CoA (Britton, 1984; Boulton ja Ratledge, 1984; Watkinson ja Morgan, 1990; Ashraf *et al.*, 1994; van Hamme *et al.*, 2003; Wentzel *et al.*, 2007). Biterminaalne oksüdatsiooni korral *n*-alkaani mõlemad terminaalsed metüülrühmad oksüdeeritakse ning tekib dikarboksüülhape, mis siseneb samuti  $\beta$ -oksüdatsiooni ratta (Kester ja Foster, 1963; Watkinson ja Morgan, 1990, Coon, 2005). Subterminaalsel oksüdatsioonil tekivad alkaanidest astmeliselt sekundaarsed alkoholid ja vastavad ketoonid. Viimaste edasisel oksüdeerimisel Baeyer–Villiger monooksügenaasiga tekib ester, millest esteraasi toimel moodustub lõpuks alkohol ja rasvhape (Joonis 1).



The diagram illustrates three pathways of fatty acid oxidation:

- 1) TERMINAALNE RADA (Terminal Pathway):** Shows the sequential oxidation of an alkane (alkaani monooksügenaas) to an alcohol (alkoholi dehüdrogenaas), then to an aldehyde (aldehüüdi dehüdrogenaas), and finally to a carboxylic acid (ω-rasvhappe monooksügenaas). The carboxylic acid can then be further oxidized to a hydroxy-carboxylic acid (alkoholi dehüdrogenaas) or a keto-carboxylic acid (aldehüüdi dehüdrogenaas).
- 2) BITERMINAALNE RADA (Intermediate Pathway):** Shows the oxidation of an alkane to a carboxylic acid, which then undergoes β-oxidation (β-oksüdatsioon) to form a shorter-chain carboxylic acid and a ketone. The ketone can be further oxidized to a hydroxy-ketone (alkoholi dehüdrogenaas) or a keto-ketone (aldehüüdi dehüdrogenaas).
- 4) FINNERTY RADA (Fenton's Reaction):** Shows the oxidation of an alkane to a hydroperoxide (dioksügenaas), which then undergoes Fenton's reaction to form a carboxylic acid and a ketone.

The diagram uses chemical structures to represent the various intermediates and products, with arrows indicating the direction of the reactions. The R group represents the alkyl chain, and the n represents the number of carbon atoms in the chain.

9

## 1.4. Alkaani hüdroksülaasid/oksügenaasid

Alkaani hüdroksülaasil on oluline roll toornafta ja selle erinevate fraktsioonide mikrobioloogilisel lagundamisel (van Beilen ja Funhoff, 2007). Alkaani hüdroksülaasi geene kasutatakse ka markeritena, et ennustada erinevate keskkondade võimet lagundada toornaftat (van Beilen *et al.*, 2003).

Lagundatava alkaani pikkus määrab ära, millist spetsiiflist alkaani hüdroksülaasi süsteemi kasutatakse ning vastavalt sellele võib neid ensüüme jaotada 3 rühma (van Beilen ja Funhoff, 2007):

1. gaasilisi alkaane (metaanist kuni butaanini) lagundavad ensüümid (metaani monooksügenaas, propaani monooksügenaas, butaani monooksügenaas);
2. vedelaid alkaane (pentaanist kuni heksadekaanini) lagundavad ensüümid (AlkB-seoselised, membraaniseoselised tsütokroom P450 valguperekonna ensüümid - CYP153 ja CYP52);
3. tahkeid alkaane (heksadekaanist pikemaid) lagundavad ensüümid (AlmA, LadA, dioksügenaas).

Alkaani hüdroksülaaside ensüümiklasside iseloomulikud omadused, lagundatavate alkaanide ahela pikkuste vahemik ning leidumine erinevates mikroorganismides on esitatud Tabelis 1.

Biotehnoloogilisest väljavaatest on alkaani hüdroksülaasid väga mitmekülgsed biokatalüsaatorid, mis viivad läbi erinevaid oksüdatsiooniprotsesse (Witholt *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2001). Biotehnoloogiliselt on huvi pakkuvad eriti pika ahelaga *n*-alkaane lagundavad termofiilsed bakteritüved (Ji *et al.*, 2013), sest võrreldes mesofiilsete bakteritega omavad nad süsivesinike lagundamisel rohkem eeliseid. Nimelt on kõrgematel temperatuuridel hüdrofoobsete ainete lahustuvus suurem, viskoossus väiksem, difusioon rakkudes kiirem ja pika ahelaga *n*-alkaanide ülekannet tahkest faasist vedelasse faasi kiirem kui madalamatel temperatuuridel (Feitkenhauer *et al.*, 2003).

**Tabel 1.** Alkaane oksüdeerivate ensüümide klassid (täiendatud van Beilen ja Funhoff, 2007; Rojo, 2010)

Ensüümiklass	Iseloomilised omadused	Alkaani moleküli pikkus*	Organism, kus leidub
sMMO, tsütoplasmaatiline metaani monooksügenaas	mitteheemne rauda sisaldav monooksügenaas	C <sub>1</sub> -C <sub>8</sub>	Bakterid
pMMO, membraaniseoseline metaani monooksügenaas	vaske sisaldav monooksügenaas	C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub>	Bakterid
PRM, propaani monooksügenaas	mitteheemne rauda sisaldav monooksügenaas, sarnane tsütoplasmaatilisele metaani monooksügenaasile (sMMOle)	C <sub>3</sub>	Bakterid
sBMO, tsütoplasmaatiline butaani monooksügenaas	mitteheemne rauda sisaldav monooksügenaas, sarnane sMMOle	C <sub>2</sub> -C <sub>9</sub>	Bakterid
pBMO, membraaniseoseline butaani monooksügenaas	vaske sisaldav monooksügenaas	C <sub>2</sub> -C <sub>9</sub>	Bakterid
CYP153	tsütoplasmaatiline tsütokroom P450	C <sub>5</sub> -C <sub>12</sub>	Bakterid
CYP52	membraaniseoseline tsütokroom P450	C <sub>10</sub> -C <sub>16</sub>	Pärmid
AlkB-seoselised	mitteheemne rauda sisaldav monooksügenaas	C <sub>3</sub> -C <sub>13</sub> või C <sub>10</sub> -C <sub>20</sub>	Bakterid
AlmA	flaviiniseoseline monooksügenaas	C <sub>20</sub> -C <sub>36</sub>	Bakterid
LadA	termofiilne flaviinist sõltuv monooksügenaas	C <sub>10</sub> -C <sub>30</sub>	Bakterid
Dioksügenaas	vaske sisaldav flaviinist sõltuv dioksügenaas	C <sub>10</sub> -C <sub>30</sub>	Bakterid

\*alaindeks näitab süsinike arvu alkaanimolekulis

### 1.4.1. Metaani monooksügenaasid

Metanotroofid on bakterid, kes tarbivad peamise süsinikuallikana metaani ning seega omavad nad olulist rolli süsinikuringes, vähendades kasvuhoonegaasi vabanemist atmosfääri (Hanson ja Hanson, 1996; Wallar ja Lipscomb, 1996; Merx *et al.*, 2001). Metanotroofid kasutavad metaani oksüdeerimiseks metanooliks kahte tüüpi metaani monooksügenaasi (MMO) komplekse – membraaniseoselised (pMMO) ja tsütoplasmaatilised (sMMO). sMMO koosneb kolmest komponendist: hüdroksülaas, NADH-sõltuv reduktaas ja regulatoorne valk ning kompleksi aktiivsaiditsentris on kaks Fe(II) aatomit. pMMO koosneb hüdroksülaasist, millel on 3 subühikut:  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$  subühik, ning on näidatud, et see sisaldab aktiivsaidis vaseatomeid. (Sazinsky ja Lippard, 2006; Hakemian ja Rosenzweig, 2007). Erinevate MMOde ekspressioon on reguleeritud vase ionide kontsentratsiooniga kasvukeskkonnas - sMMO ekspresseerub ainult madalatel, samas kui pMMO ekspresseerub vaid kõrgetel vase ionide kontsentratsioonidel (Jahng ja Wood, 1996). pMMOI on kitsam substraadispetsiifika kui sMMOI, sest on võimeline oksüdeerima kaheksa süsiniku pikkuse alkaani asemel ainult kuni viit süsinikku sisaldavat alkaani (Green ja Dalton, 1989).

Kõik teadaolevad metanotroofid (v.a atsidofiilsed metanotroofid) omavad pMMOd, ning osadel neist on leitud ka sMMO (Murell *et al.*, 2000; Lieberman ja Rosenzweig, 2004; Hakemian ja Rosenzweig, 2007). Metaani monooksügenaasi ekspresseerivad liigid kuuluvad hõimkonda *Alphaproteobacteria* perekondadesse *Methylobacter*, *Methylobacter*, *Methylobacterium*, *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*, *Methylosinus* ja *Methylocystis*. (Murell *et al.*, 2000). Metanotroofide võimet oksüdeerida alkaane, alkeene, estreid, metaani halogeenderivaate ja tsüklilisi ning aromaatsaid ühendeid kasutatakse ära bioremediatsiooni protsesside läbiviimisel (Sullivan *et al.*, 1998).

### 1.4.2. Propaani ja butaani monooksügenaasid

Teisi gaasilisi alkaane, nagu propaan ja butaan, lagundavad sellised bakteritüved, kes ekspresseerivad propaani või butaani monooksügenaase, mis on ülesehituselt sarnased pMMOga või sMMOga. Perekonna *Gordonia* erinevad tüved omavad kitsa substraadispetsiifikaga propaani monooksügenaase, mis oksüdeerivad vastavalt bakteriliigile propaani terminaalselt ja/või subterminaalselt. See propaani monooksügenaas on ehituselt sarnane sMMO-ga (Kotani *et al.*, 2003). Sarnaseid propaani monooksügenaase on leitud ka

teistest propaani lagundavatest bakteritest, näiteks *Mycobacterium* sp. TY-6 ja *Pseudonocardia* sp. TY-7 (Kotani *et al.*, 2006).

*Nocardioides* sp. tüvi CF8 sisaldab butaani monooksügenaasi, mis on ülesehituselt sarnane pMMO-le ja võimaldab kasvu süsinikahelatel C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> (Hamamura *et al.*, 2001). Samas kui *Thauera butanivorans* tüvi ATCC43655, mida varem nimetati *Pseudomonas butanovora* (Dubbels *et al.*, 2009), on võimeline terminaalset lagundama alkaane pikkusega C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> (Halsey *et al.*, 2006), kasutades selleks tsütoplasmaatilist kolmekomponendilist butaani monooksügenaasi (BMO) süsteemi. Dubbels jt (2007) näitasid oma töös, et BMO kompleksi kuuluvad: raudasisaldav hüdroksülaas, NADH-oksidoreduktaas ja väike regulatoorne valk. Kuigi nimetatud sBMO on väga homoloogne sMMOga, siis metaani lagundamise võimet pole BMO-l leitud (Halsey *et al.*, 2006).

#### **1.4.3. Membraaniseoselised alkaani hüdroksülaasid, AlkB valguperekond**

Membraaniseoselise alkaani hüdroksülaasi (AlkB) süsteemid on looduses laialt levinud – 45 bakteriliigis on kirjeldatud enam kui 250 homoloogi (Smits *et al.*, 1999; van Beilen *et al.*, 2002, van Beilen *et al.*, 2003; van Beilen ja Funhoff, 2007; Wang *et al.*, 2010). Neid süsteeme on leitud nii grampositiivsetes kui ka gramnegatiivsetes mikroorganismides. AlkB süsteem on võimeline katalüüsima mitmeid erinevaid reaktsioone, nagu lineaarse ja hargnenud ahelaga alifaatsete-, tsükliliste- ja alküülaromaatsete ühendite hüdroksülatsoon, hargnenud ahelaga metüüleetrite demetülatsoon või terminaalsete alkaanide epoksüdatsoon (van Beilen *et al.*, 2005b). Näidatud on ka AlkB võimet lagundada gaasilisi alkaane - propaan ja *n*-butaan (Johnson ja Hyman, 2006).

Kõige paremini on uuritud alkaanide lagundamise rada, mida kodeerib *Pseudomonas putida* GPo1 OCT plasmiid. Algselt nimetati seda bakterit *Pseudomonas oleovorans*, aga hiljem identifitseeriti kui *Pseudomonas putida* (Baptist *et al.*, 1963; van Beilen *et al.*, 2001). Lagundamisraja esimene ensüüm on membraaniseoseline monooksügenaas AlkB, mis hüdroksüleerib alkaane terminaalset. Alkaani hüdroksülaasi süsteem koosneb kolmest valgust: rubredoksiinist (AlkG), rubredoksiini reduktaasist (AlkT) ja alkaani hüdroksülaasist (AlkB). Rubredoksiini reduktaas kannab kofaktor FAD abil elektrone NADH molekulilt rubredoksiinile, mis omakorda kannab elektronid AlkB-le (van Beilen *et al.*, 1992; Shanklin *et al.*, 1994).

Ji jt 2013. a. ülevaateartiklis esitatud informatsiooni alusel ei ole seni määratud AlkB detailset struktuuri ning puuduvad mitmed biokeemilised andmed, mis iseloomustaksid AlkB laia subtraadi-spektrit. Siiski tänu AlkB topoloogilisele mudelile on saadud teadmisi tema struktuuri ja funktsiooni vaheliste seoste kohta. Ennustatult koosneb AlkB kuuest transmembraansest segmentist ja tsütoplasmapoolsest katalüütilisest saidist, mis koosneb neljast histidiini sisaldavast järjestuse motiivist, mis on omakorda seotud kahe raua aatomiga (van Beilen *et al.*, 1992; Shanklin *et al.*, 1994). Nendest kahest raua aatomist koosnev klaster võimaldab hapnikust sõltuvat alkaani molekuli aktivatsiooni üle substraatses radikaalse vaheühendi (Shanklin *et al.*, 1997; Austin *et al.*, 2000; Bertrand *et al.*, 2005). Üks hapniku aatomitest kantakse terminaalsete metüülrühmale ning teine redutseeritakse veeks elektronide transpordil rubredoksiinile. Oksüdatsioon on regio- ja stereospetsiifiline (van Beilen *et al.*, 1996).

Kuus transmembraanset segmenti moodustavad hüdrofoobse tasku, kuhu asetub alkaani molekul nii, et terminaalne metüülrühm paikneb lähestikku vastava histidiini järjestusega, mis on seotud raua aatomitega (van Beilen *et al.*, 2005b). Mutageneesi uurimisel selgus, Trp55 limiteerib alkaani molekuli, mida AlkB on võimeline oksüdeerima, suurust. Eeldatav kaugus Trp55 ja histidiini jääkide vahel on sarnane  $n$ -C<sub>13</sub> molekuli pikkusega. Seega Trp55 hargnenud ahel võib muuta hüdrofoobse tasku ehitust ja takistada seeläbi C<sub>13</sub> pikemate alkaanide sisenemist sügavamale taskusse, mistõttu ei saa sobivalt joonduda terminaalne metüülrühm ja katalüütiline sait. Vähem hargnenud aminohappe, näiteks Ser ja Cys, esinemine 55 positsioonis võimaldab pikkade ahelatega alkaanidel sobituda hüdrofoobsesse taskusse (van Beilen *et al.*, 2005b; Rojo, 2010).

#### **1.4.4. Tsütokroom P450 valguperekonna ensüümid**

Tsütokroom P450 ensüümid on terminaalset monooksügenaasid, mida on kirjeldatud kõikides elu domeenides, alates prokariootidest (enamasti tsütoplasmaatilised) kuni eukariootideni (enamasti membraaniseoselised) (Ji *et al.*, 2013). Tsütokroomid P450 on rauda sisaldavad valgud, mis vajavad ferredoksiini ja ferredoksiini reduktaasi, et kanda elektrone NAD(P)H molekulilt tsütokroomile. Tsütokroom P450 ensüümid võivad oma funktsioonilt asendada *Pseudomonas putida* GPo1 ensüümi AlkB, mis näitab nende rühmitumist alkaani hüdroksülaaside hulka (van Beilen *et al.*, 2006). CYP153 ensüümid, mis kuuluvad klass I tsütokroom P450 valguperekonda, viivad läbi kõrge regioselektiivsusega terminaalset C<sub>6</sub>-C<sub>11</sub> alkaanide (vastav ensüüm on pärit bakterist *Mycobacterium* sp. HXN-

1500) ning C<sub>7</sub>-C<sub>9</sub> (vastav ensüüm on pärit bakterist *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444) oksüdatsiooni (Funoff *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2011). Sarnaseid ensüüme on leitud ka erinevatest aktinobakterite ja proteobakterite tüvedest (Sekine *et al.*, 2006; van Beilen *et al.*, 2005a, van Beilen *et al.*, 2006).

#### 1.4.5. Ensüümid pikkade alkaani ahelate lagundamiseks

Pikki alkaane (C<sub>20</sub> ja pikemad) on võimelised lagundama nii grampositiivsed (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Geobacillus*, jt.) kui ka gramnegatiivsed bakterid (*Acinetobacter*, *Alcanivorax*, jt.) (Asharf, 1994; Throne-Holst, 2006). Termofiilsel bakteril *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, kes kasvab C<sub>15</sub>-C<sub>36</sub> alkaanidel, on kirjeldatud alkaani hüdroksülaas LadA (Feng *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). LadA on ekstratsellulaarne valk, mille struktuur on erinev AlkB ja tsütokroom P450 struktuuridest. Kristallstruktuuri uurimisel selgus, et LadA on kahekomponente flaviinistsõltuv oksügenaas, mis kuulub bakteriaalse lutsiferaasi valkude perekonda (Li *et al.*, 2008). Bakteritel *Acinetobacter* sp. M-1 ja *Acinetobacter* sp. ADP1 on kirjeldatud kaht tüüpi membraaniseoselisi alkaani hüdroksülaase (AlkB analoogid) – AlkMb, mis lagundab C<sub>22</sub> ja pikema ahelaga alkaane ning AlkMa, mis lagundab C<sub>22</sub>-st lühemaid alkaane. *Acinetobacter* tüvedel M-1 ja DSM17874 ning bakteril *Alcanivorax borkumensis* SK2 on leitud veel kolmas, tsütoplasmataoline ensüüm AlmaA. Viimane on Baeyer-Villiger'i tüüpi monooksügenaas, mis viib läbi subterminaalset C<sub>20</sub> kuni C<sub>36</sub> alkaanide oksüdatsiooni (Throne-Holst, 2006). Hiljuti on *almaA* geen leitud ka bakterist *Alcanivorax dieselolei* B-5 (Liu *et al.*, 2011).

### 1.5. Naftasaadusi lagundavad mikroorganismid

Bakterid võivad süsiniku- ja energiaallikana kasutada väga erinevaid ühendeid (van Beilen *et al.*, 2003; Wentzel *et al.*, 2007). Vaatamata bakterite mitmekülgsele ainevahetusele ei ole alkaanid enamasti eelistatud substraatideks (van Beilen *et al.*, 2003; Wentzel *et al.*, 2007). Samas on süsivesinikklastiliste bakterite rühm, kes on keskendunud ainult süsivesinike lagundamisele ning on seetõttu olulised alkaanide lagundamisel saastunud keskkondadest (Margesin *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 2004; Head *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007). Enamik neist kuuluvad klassi *Gammaproteobacteria* seltsi *Actinomycetales*, kuigi alkaane lagundavaid baktereid on leitud nii grampositiivsete kui ka teiste gramnegatiivsete bakterite seast (Nie *et al.*, 2011). Peamiselt on leitud süsivesinikke lagundavaid baktereid neljast

järgnevast hõimkonnast: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ja *Proteobacteria* (Prince *et al.*, 2010).

Enamasti esineb süsivesinikklastilisi baktereid keskkonnas väga väikesel määral ning alles õlireostuse toimumisel suureneb nende arvukus ja muutub mikroobikoosluse struktuur saastunud piirkonnas (Harayama *et al.*, 2004). Üheks sedasi käituvaks bakteriperekonna näiteks on *Alcanivorax*, kelle tüved on võimelised lagundama väga erinevaid alkaane, mis võib olla tingitud sellest, et nad sageli omavad rohkem kui ühte alkaani hüdroksülaasi geeni (Hara *et al.*, 2004). Näiteks palju uuritud merebakteril *Alcanivorax borkumensis* SK2 on leitud kolm P450, kaks *alkB* ning kaks *almA* geeni (Golyshin *et al.*, 2003; van Beilen *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 2004; Sabirova *et al.*, 2006; Schneiker *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007).

Konkurentsi katsed bakteritega *Alcanivorax borkumensis* ST-T1 ja *Acinetobacter venetianus* T4 näitasid, et imiteeritud õlireostuse korral (toitainete lisamisel) domineerib merevees *Alcanivorax borkumensis* (Hara *et al.* 2003). *Alcanivorax* esindajate domineerimine õlireostusega merevees ei seostatud antud juhul mitte nende võimega kasvada *n*-alkaanidel, vaid hoopis nende suutlikkusega lagundada hargnenud ahelaga alkaane (Hara *et al.*, 2003). *Alcanivorax*'i lai substraadispetsiifilisus võimaldabki neil olla edukas naftasaaduste lagundamisel saastunud keskkondades.

Mikroobide reageerimine õlireostusele meres sõltub paljudest erinevatest teguritest nagu naftasaaduse keemiline koostis ja ilmastik, aga ka keskkonna tingimustest, temperatuurist ja toitainete kontsentratsioonist (McGenity *et al.*, 2012). Näiteks lämmastiku ja fosfori kättesaadavus mõjutab süsivesinike lagundamist (Atlas ja Bartha, 1972). Seega kui neid pole piisavalt keskkonnas, siis see võib raskendada bakterite alkaanide lagundamise võimet. Külmates veekeskkondades (1-20°C) seostatakse alkaanide lagundamist *Alcanivorax* spp. asemel pigem psührofiilse süsivesinikklastilise bakteriperekonna *Oleispira*'ga (Coulon *et al.*, 2007; Golyshin *et al.*, 2010). Samas parasvöötme piirkondades võib mõnikord bakter *Alcanivorax* ssp. välja tõrjuda bakteri *Thalassolituus* spp. (McKew *et al.*, 2007).

Nafta komponentide lagundamisel on näidatud ajalist lagundamise järjekorda, mis sõltub lagundatavate ühendite struktuurist. Kõigepealt lagundatakse lihtsama struktuuriga lineaarsed ja hargnenud ahelaga alkaanid ning alles hiljem keerukama struktuuriga aeglasemalt lagundatavad polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (PAH) (Vila *et al.*, 2010). PAH-de ja nende alküülderivaatide lagundamise kohta merekeskkonnast on vähe andmeid, kuid on



näidatud, et perekonna *Cycloclasticus* esindajad omavad selles olulist funktsiooni (Kasai *et al.*, 2002; McKew *et al.*, 2007).

Läänemere mikroobikooslust on uuritud peamiselt 16S rRNA-l põhinevate meetoditega (Hagström *et al.*, 2000; Edlund ja Jansson; 2008; Riemann *et al.*, 2008; Mitt, 2009; Koskinen *et al.*, 2011; Viggor *et al.*, 2013). Kuna Läänemere soolsus on liiga kõrge magedavee organismidele ning liiga madal mereorganismidele (Paavola *et al.*, 2005), siis ookeanidega võrreldes Läänemere mikroobikooslus ei ole nii mitmekesine (Koskinen *et al.*, 2011). Siiski on Läänemerest leitud erinevaid magevee bakterite klasse nagu *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* ja *Betaproteobacteria*, (Riemann *et al.*, 2008; Mitt, 2009; Kiiker, 2010) ning ka tüüpilisi merebaktereid klassidest *Alphaproteobacteria* ja *Gammaproteobacteria* (Hagström *et al.*, 2000, Kiiker, 2010). 16S rRNA põhised analüüsid näitavad, et nii *Gammaproteobacteria* kui ka *Actinobacteria* klassi esindajad on olulised alkaanide lagundamisel Läänemere rannikuvetes (Viggor *et al.*, 2013).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Antud bakalaureusetöö eksperimentaalse osa eesmärkideks on:

- a. iseloomustada *alkB* klooniraamatukogu põhjal 2009. aastal võetud nelja Läänemere veeproovipunkti mitmekesisust
- b. täiendada 2008. aasta Läänemere veeproovipunktide *alkB* klooniraamatukogusid
- c. võrrelda 2008. ja 2009. aastal võetud veeproovipunktide *alkB* klooniraamatukogusid

### 2.2. Materjal ja metoodika

#### 2.2.1. Veeproovide võtmine Läänemerest ja koosluse DNA eraldamine

Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituudi töötajad võtsid uuritavad veeproovid neljast erinevast Läänemere piirkonnast (Tabel 2) 2008. ja 2009. aastal augustist novemberini. Nelja proovipunkti täpsed asukohad on märgitud Tabelis 2 ja LISA 1 joonisel. Proovid võeti merevee pindmisest kuni 1-meetrise kihist ning transporditi steriilsetes 12-liitrilise mahutavusega kanistrites. Laboris määrati veeproovide pH ja soolsus mõõteriista Multi340i (WTW, Saksamaa) abil (Tabel 2). Koosluse DNA eraldamiseks filtreeriti veeproovid ühe ja kahe liitri kaupa läbi 0,2 µm poori suurusega 47 mm diameetriga steriilsete filtrite (Sartorius AG, Saksamaa). Filtrid asetati steriilsetesse koekultuuritopsidesse ja säilitati -80°C juures kuni DNA eraldamiseni.

Koosluse DNA eraldati filtritelt, kasutades MO BIO PowerSoil™ DNA Kit-i (MO BIO Laboratories, Inc., Ameerika Ühendriigid), järgides tootjapoolset protokollit (töö teostasid Riinu Kiiker ja Kertu Tiirik).

**Tabel 2.** Proovivõetupunktide asukohad, proovi võtmise ajad, veeproovide füüsilised ja keemilised parameetrid

Proovipunkt	A	B	C	D
<b>Piirkond</b>	Tallinna laht	Soome lahe lääneosa	Narva laht	Liivi laht
<b>Proovivõtu kuupäevad</b>	29.08.08 / 07.09.09	29.08.08 / 21.11.09	03.09.08 / 10.09.09	22.09.08 / 16.09.09
<b>Koordinaadid</b> (põhjalaius; idapikkus)	59°32'12''; 24°41'18''	59°28'60''; 22°57'00''	59°28'30''; 28°00'30''	57°37'00''; 23°37'00''
<b>Kaugus rannajoonest</b>	5,60 km	36,55 km	1,80 km	40,53 km
<b>Lisa- informatsioon</b>	Tihe laeva- liiklus	Avameri	Narva jõe suue 2 km kaugusel	Kinnine laht
<b>Füüsilised ja keemilised parameetrid, 2008/2009</b>				
pH	7,65 / 7,90	8,10 / 7,74	7,70 / 7,60	8,05 / 7,86
Soolsus, ‰	5,8 / 6,0	6,3 / 6,1	3,7 / 4,1	5,4 / 5,3

### 2.2.2. *AlkB* geenifragmendi amplifitseerimine

Geeni *alkB* amplifitseerimiseks (~340 bp) kasutati PCR-i reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl, mis sisaldas 1x lõppkontsentratsiooniga PCR puhvrit [75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20], 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM igat nukleotiidi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,8 µM praimerit *alkB*-R ja *alkB*-F (Tabel 3), Taq DNA *Polymerase* 0,01 U µl<sup>-1</sup> ja lisati 5 µL koosluse DNA-d.

Amplifikatsiooniprogramm algas initsiatsioonietapiga 94°C juures 5 minutit, sellele järgnes 35 tsüklit, kus iga tsükel koosnes kolmest etapist: DNA ahelate denatureerimine 94°C juures 1 min, praimerite seondumine DNA ahelatega 50°C juures 45 sekundit, DNA süntees 72°C juures 30 sekundit ning pärast tsükleid toimus lõppekstensioon 72°C juures 10 minutit. Positiivse kontrollina kasutati *Pseudomonas fluorescens* TN43 (CELMS) lüsaati ja negatiivse kontrollina MilliQ vett.

**Tabel 3.** Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimetus	5'→3' järjestus	Seondumis-temperatuur	Viide
alkB-F	TAC GGN CAC TTY TAC VYC GA <sup>1</sup>	50 °C	Viggor <i>et al.</i> , 2013
alkB-R	CCR TAR TGY TCG AGR TAG TT <sup>1</sup>		
GC-klamber	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGG <sup>2</sup>		Muyser <i>et al.</i> 1993

<sup>1</sup>- Nukleotiidide tähistused: **N**: A, T, G või C ; **Y**: C või T; **R**: A või G; **V**: A, C või G

<sup>2</sup>- GC-klamber on lisatud alkB-F praimeriga otsa

### 2.2.3. Gelelektroforees

*AlkB* geenifragmendi amplifikatsiooni edukuse ja negatiivse kontrolli puhtuse kontrollimiseks kasutati 1x TAE puhvris (50mM Tris-atsetaat; 1mM EDTA; pH 8,2) valmistatud 1% agarosgeeli, millele lisati etiidiumbromiidi (EtBr) kontsentratsioon 0,5 g ml<sup>-1</sup>. Geeli hambasse kanti 5 µl proovi segatuna 1 µl laadimispuhvriga (6x MassRuler™ Loading Dye Solution; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% broomfenoolsinine; 60% glütserool; 60 mM EDTA; Fermentas, Leedu). Produkti suuruse hindamiseks kasutati 1 kb DNA suurusmarkerit (GeneRuler™; Fermentas, Leedu). Elektroforees viidi läbi 1x TAE puhvris 100 V juures. Geeli pildistati UV transilluminaatoris.

### 2.2.4. *AlkB* klooniraamatukogu koostamine

Agarosgeelist väljalõigatud koosluse DNAlt amplifitseeritud *alkB* geenifragmendid puhastati enne kloonimist QIAquick Gel Extraction Kit'iga (Qiagen), järgides tootjapoolset protokollit. DNA lahus säilitati -20°C juures.

Vastavalt InsTAclone™ PCR Cloning Kit'i (Fermentas, Leedu) protokollile ligeeriti *alkB* geeni sisaldav PCR-i fragment vektorisse pTZ57R/T.

Transformeerimiseks lisati 200 µl kompetentsetele *E. coli* DH5α rakkudele (Inoue *et al.*, 1990) 5µl ligeerimisegu. Transformatsioonisegu hoiti 30 minutit jääl, siis tehti kuumašokk 41,5 °C juures 1,5 minutit ning lõpuks hoiti segu 5 minutit jääl. 100 µl segu plaaditi LB-tardsöötmele, kuhu oli eelnevalt selekteerimise eesmärgil lisatud ampitsilliini (Amp; 150 µg

ml<sup>-1</sup>), isopropüül- $\beta$ -D-tiogalaktoosiidi (IPTG; 48  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) ja 5-bromo-4-kloro-3-indoüül- $\beta$ -D-galaktopüranosiidi (X-Gal; 80  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Transformante kasvatati 37°C juures üleöö ja kloneerimise õnnestumist hinnati sini-valge testi abil. Edaspidises töös kasutati valgeid kolooniaid. Valitud bakterikolooniatest võetud rakumass külvati steriilse tikuga LB-tardsöötmele tassile, mis sisaldas Amp-i (150  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) ning rakke kasvatati 37 °C juures juures piisava rakumassi moodustumiseni umbes 24 tundi.

*AlkB* geeni insertiooniga plasmidi olemasolu kloonides kontrolliti *alkB*-R ja *alkB*-F praimeritega (Tabel 3) läbi viidud PCR analüüsiga, mis teostati eelnevalt kirjeldatud meetodil (2.2.2.). LB-Amp-tardsöötmele üleöö kasvatatud kloonide rakke lisati segusse steriilse pipetiotsikuga. PCR analüüsi tulemust kontrolliti geelelektroforeesiga eelnevalt kirjeldatud meetodi alusel (2.2.3.). Saadud positiivseid kloonide analüüsiti järgmiseks denatureeriva gradiendiga geelelektroforeesil (DGGE).

### **2.2.5. Denatureeriva gradiendiga geelelektroforees (DGGE)**

Geenifragmentide DGGE analüüs (Muyzer *et al.*, 1993) viidi läbi DCode™ elektroforeesisüsteemiga (Bio-Rad Laboratories, Inc.), kasutades 40-65% denaturantide gradiendiga (100% denatureeriv geel sisaldab 40% deioniseeritud formamiidi ja 7 M ureat) 8% polüakrüülamiidgeeli (akrüülamiid-bisakrüülamiid segu 37,5:1), mis oli valmistatud 1x TAE puhvris. Polümerisatsiooni katalüsaatoriteks olid ammooniumperoksüsulfaat (APS; 0,4  $\mu$ l ml<sup>-1</sup>) ja tetrametüületüülenediamiin (TEMED; 0,53  $\mu$ l ml<sup>-1</sup>). Geeli hambad valmistati denaturantideta akrüülamiidide lahusest (APS 0,83  $\mu$ l ml<sup>-1</sup>; TEMED 1  $\mu$ l ml<sup>-1</sup>). Geeli ühte hambasse kanti 8  $\mu$ l *alkB*-R ja *alkB*-F-GC-klamberpraimeritega (Tabel 3) amplifitseeritud PCR produkti ja 5  $\mu$ l laadimispuhvri (6x MassRuler™ Loading Dye Solution; Fermentas, Leedu) segu. Elektroforees viidi läbi 1x TAE puhvris konstantsel temperatuuril 60°C, 13 tundi ja 100V pinge juures. Geeli värviti 20 minutit MilliQ vees, mis sisaldas 0,5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> etiidiumbromiidi ning pärast seda pesti geeli 20 minutit MilliQ-s. Geeli pildistamiseks kasutati Molecular Imager® Gel Doc™ XR (Bio-Rad Laboratories, Inc.) UV transilluminaatorit ja arvutiprogrammi Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

### 2.2.6. Sekveneerimine

*AlkB* geenifragmentide sekveneerimiseks töödeldi PCR segu praimerite katki lõikamiseks ja nukleotiidide inaktiveerimiseks ensüümidega eksonukleas I (ExoI; Fermentas, Leedu) lõppkontsentratsiooniga  $0,36 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$  ja kreveti aluseline fosfataas (SAP; Fermentas, Leedu) lõppkontsentratsiooniga  $0,14 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ . Töötlus toimus  $37^{\circ}\text{C}$  juures 15 minuti jooksul, seejärel ensüümid inaktiveeriti  $80^{\circ}\text{C}$  juures (15 minutit). Sekveneerimise edasised etapid viidi läbi BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'i (Applied Biosystems Inc., USA) protokollil põhjal. Reaktsiooni läbi viimiseks kasutati PCR programmi, mis koosnes 40 tsüklist ja kus iga tsükkel koosnes 3 etapist: ahelate denaturatsioon  $95^{\circ}\text{C}$  juures 15 sekundit, praimerite seondumine  $50^{\circ}\text{C}$  juures 10 sekundit ja süntees  $60^{\circ}\text{C}$  juures 45 sekundit. Proovid sekveneeriti firma Applied Biosystems täisautomaatse kapillaarsekvenaatoriga 3730xl DNA Analyzer.

### 2.2.7. Sekveneeritud *alkB* järjestuste analüüs

Sekveneeritud DNA järjestuste analüüsimiseks kasutati programmi BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Saadud kloonide *alkB* geenijärjestusi ning nendest transleeritud ennustatavaid valgujärjestusi võrreldi „The Basic Local Tool Alignment Search Tool“ (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) otsingumootori abil järjestustega GeneBank andmebaasis. Lisaks arvutab BLAST vaste ja sisestatud järjestuse vahelise statistilise olulisuse. Ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste rühmitamiseks ning akumulatsioonigraafikute tegemiseks kasutati interneti põhiseid vabavarasid FastGroupII ja ASLO. FastGroupII ([http://fastgroup.sdsu.edu/fg\\_tools.htm](http://fastgroup.sdsu.edu/fg_tools.htm)) on tööriist mikroobikoosluste mitmekesisuse tuvastamiseks. FastGroupII rühmitab analüüsitud järjestused kasutaja poolt etteantud parameetrite järgi ning väljastab tulemused, mis sisaldavad nii sisestatud järjestuste rühmitamise informatsiooni kui ka statistilist hinnagut uuritava koosluse mitmekesisuse kohta (Yu *et al.*, 2006). Ühenduse „Association for the Sciences of Limnology and Oceanography“ (ASLO) koduleheküljel on sisend (<http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>), mis võimaldab hinnata koostatud klooniraamatukogu suurust ja piisavust (Kemp ja Aller; 2004). ASLO võimaldab leida klooniraamatukogu teoreetiliselt kõikide erinevate võimalike järjestuste arvu, kasutades selleks  $S_{\text{Chao}}$  ja  $S_{\text{Ace}}$  indekseid, mille arvutamine põhineb matemaatilistel valemitel, kus kasutatakse saadud fülotüüpide arve.

## 2.3. Tulemused ja arutelu

Alkaani hüdroksülaasidel on oluline roll toornafta lagundamisel ning kuna Läänemeri on väga tiheda laevaliiklusega ning ka üks saastatumaid meresid, siis mikroobide alkaanide lagundamisvõime uurimine on võimalus teada saada Läänemere üldise alkaanide biodegratatiivse potentsiaali kohta. Alkaani hüdroksülaasi kodeeriva *alkB* geenide esinemisest Läänemere mikroobikoosluses on vähe teada, kuna rohkem on uuritud üldist mikroobset mitmekesisust ja dünaamikat (Hagström *et al.*, 2000; Riemann *et al.*, 2008; Koskinen *et al.*, 2011). Alkaani hüdroksülaaside seast on kõige rohkem uuritud AlkB, mida on leitud mullast, põhjaveest (van Beilen *et al.*, 2003; Whyte *et al.*, 2002), pinnaveest (Wang *et al.*, 2010) ja Alaska ja Antarktika setetest (Sotsky *et al.*, 1994; Kuhn *et al.*, 2009).

Antud bakalaureusetöös uuriti neljast erinevast Läänemere proovivõtupunktist 2008 ja 2009. aastal võetud pinnaveeproovidest eraldatud koosluse DNAlt amplifitseeritud *alkB* geeni klooniraamatukogudest saadud ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste mitmekesisust. Proovivõtupunktid paiknevad Tallinna (A), Soome (B), Narva (C) ja Liivi (D) lahes (LISA 1, Tabel 2). Positiivseid kloone analüüsiti denatureeriva gradiendiga geelelektroforeesil (DGGE) eristamaks erineva liikumiskiirusega ja seega ka erineva *alkB* järjestusega kloone, mis sekveneeriti ning mille alusel koostati akumulatsioonigraafikud, AlkB fülogeneetiline puu ja sektordiagrammid.

### 2.3.1. 2008. ja 2009. aasta *alkB* klooniraamatukogude koostamine

Läänemere mikroobikoosluse membraaniseoselise alkaani hüdroksülaasi geeni mitmekesisuse uurimiseks amplifitseeriti koosluse DNAlt kōdupositsioonidega praimeritega *alkB*-R ja *alkB*-F alkaani hüdroksülaasi katalüütilise saidi histidiiniklastrite vahele jäävalt alalt ~370 bp suurune geenifragment. Saadud produktid puhastati ning ligeeriti pTZ57R/T vektorisse ja transformeeriti kompetentsetesse *E. coli* DH5α rakkudesse. Inserteerunud *alkB* geenifragmentide tuvastamiseks analüüsiti kloone esmalt PCR meetodil ning saadud positiivseid kloone DGGE meetodil.

Riinu Kiiker'i koostatud 2008. aasta A ja C proovide klooniraamatukogusid täiendati oluliselt antud bakalaureusetöö praktilise osa raames vastavalt 47 ja 46 klooniga, millega tagati klooniraamatukogude parem kattuvus (Tabel 4). Täiendatud 2008. aasta klooniraamatukogude analüüsi tegi käesoleva töö autor.

2009. aasta veeproovidest eraldatud koosluse DNAlt amplifitseeritud *alkB* geeni klooniraamatukogudest kontrolliti kokku 450 kloon, millest oli *alkB* geenifragmendiga kloone 257 (Tabel 4).

**Tabel 4.** 2008 ja 2009 aasta proovivõtupunktide *alkB* geeni klooniraamatukogude analüüs. Esitatud on kontrollitud kloonide arv, positiivsete kloonide arv, erinevate ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste arv ning teoreetiliselt võimalike AlkB järjestuste arv  $S_{Chao}$  ja  $S_{ACE}$  indeksite järgi

Proovivõtu- punkt	Kontrollitud kloonide arv <sup>1</sup>	Positiivsete kloonide arv <sup>1</sup>	Erinevate AlkB järjestuste arv <sup>2</sup>	Teoreetiliselt võimalike erinevate AlkB järjestuste arv <sup>3</sup>	
				S <sub>Chao</sub>	S <sub>ACE</sub>
2008					
A	169 (69)	62 (47)	6	10	10
B	100	22	4	4	4
C	195 (66)	78 (46)	16	22	21
D	140	56	6	6	6
Kokku:	604 (135)	218 (94)	19	30	22
2009					
A	150	77	6	6	6
B	86	39	8	10	14
C	127	74	11	15	13
D	87	67	6	7	8
Kokku:	450	257	17	22	23

<sup>1</sup>- 2008 aasta klooniraamatukogude täiendavate kloonide arv on toodud sulgudes kontrollitud ja positiivsete kloonide koguarvu järel

<sup>2</sup>- FastGroupII programmiga leitud erinevate ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste arv (*Cutoff*=82%)

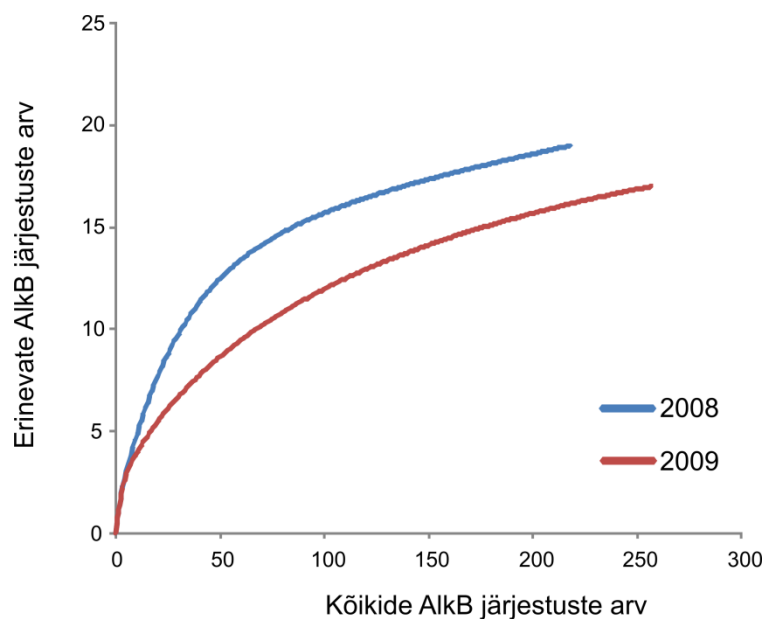
<sup>3</sup>- ASLO programmiga leitud teoreetiliselt võimalike ennustatavate AlkB aminohappeliste arv  $S_{Chao}$  ja  $S_{ACE}$  indeksite järgi



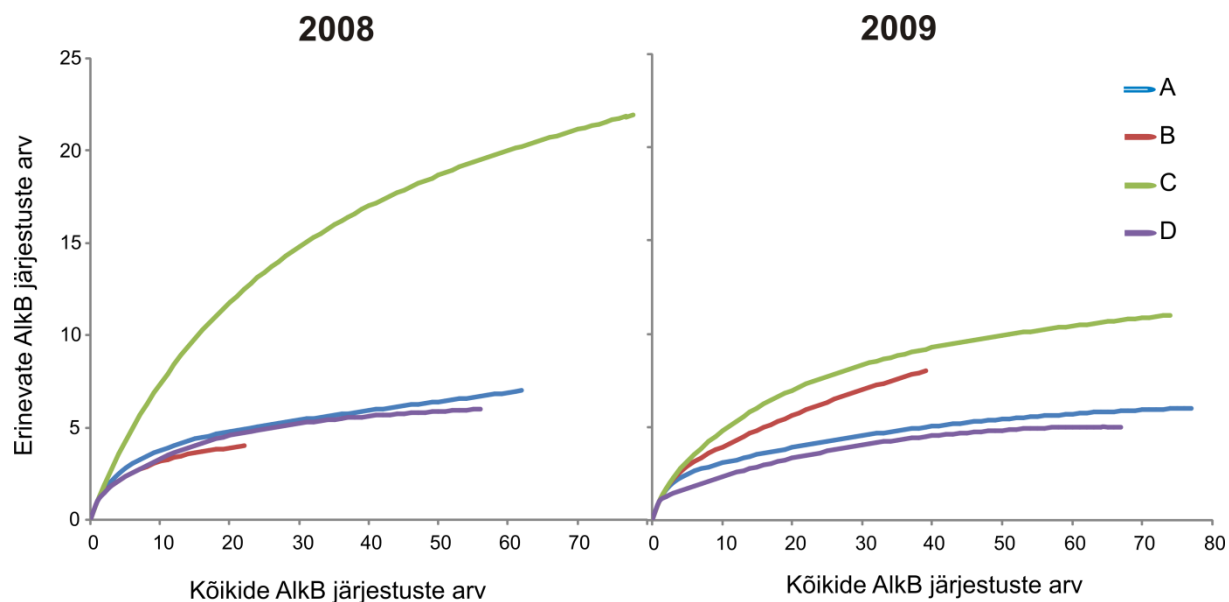
### 2.3.2. *AlkB* klooniraamatukogude mitmekesisuse analüüs

*AlkB* geenifragmendiga kloonide DGGE analüüsil (Muyzer *et al.*, 1993) eristati erineva liikumiskiirusega ning seega ka erineva nukleotiidses järjestustega kloonid. Sama liikumiskiirusega kloonid grupeeriti üheks rühmaks ning sekveneerimiseks valiti juhuslikult üks esinduskloon (täpsem kirjeldus on toodud bakalaureusetöös Kiiker, 2010). Transleeritud *AlkB* järjestused (100 aa) sisestati rühmitamiseks FastGroupII programmi, kasutades *Cutoff*-väärtusena 82%. *Cutoff*-väärtus näitab kui suur peab olema ühte gruppi rühmitatud erinevate järjestuste vaheline identsus ning antud töös kasutatud väärtus valiti, lähtudes erinevates teadusartiklites *AlkB* järjestuste analüüsil kasutatud väärtustest (Kuhn *et al.*, 2009; Wasmund *et al.*, 2009; Guibert *et al.*, 2012). Kokku leiti antud analüüsi tulemusena erinevaid ennustatavaid *AlkB* aminohappelisi järjestusi (OPF, *Operational protein families*) 2008. ja 2009. aasta *alkB* geeni klooniraamatukogudest kokku vastavalt 19 ja 17.

Programmi FastGroupII väljundist saadud andmetest koostati *alkB* klooniraamatukogude mitmekesisuse hindamiseks akumulatsioonigraafikud (Joonis 2, Joonis 3), mis kirjeldavad erinevate *AlkB* järjestuste sõltuvust kõikidest analüüsitud *alkB* klooniraamatukogu järjestustest. Tabelis 4 on esitatud ka antud programmi poolt leitud erinevate *AlkB* järjestuste arv ning programmiga ASLO leitud teoreetiliste võimalike *AlkB* järjestuste arvud  $S_{\text{Chao}}$  ja  $S_{\text{ACE}}$  indeksitena. Akumulatsioonikõvera järsk tõus väljendab, et alguses kui on kontrollitud väike osa kloone, on kergemini leitavad domineerivad järjestused. Suurema hulga kloonide kontrollimisel hakkab akumulatsioonikõver lähenema platoole, mis näitab et vaid väga haruldased järjestused on veel leidmata (Sanders, 1968). 2008. ja 2009. aasta summeeritud *alkB* klooniraamatukogude akumulatsioonikõveratelt on näha, et mõlema aasta summaarsed klooniraamatukogud on piisavalt iseloomustatud, kuna akumulatsioonikõverad on jõudnud platoonle (Joonis 2). Mõlema aasta kõikide *alkB* klooniraamatukogude kloonide piisavust näitavad ka Tabelis 4 toodud andmed, kus 2008. aasta B ja D proovivõtupunktidest saadud erinevate *AlkB* järjestuste ning 2009. aasta proovivõtupunktist A leitud erinevate *AlkB* järjestuste arv on võrdne  $S_{\text{Chao}}$  ja  $S_{\text{ACE}}$  indekste järgi leitud teoreetiliste võimalike *AlkB* järjestuste arvuga.



**Joonis 2.** *AlkB* klooniraamatukogudest saadud ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste (100 aa) põhjal koostatud 2008. ja 2009. aasta proovivõtupunktide summaarsed akumulatsioonigraafikud (*Cutoff*-väärtus 82%).



**Joonis 3.** *AlkB* klooniraamatukogudest saadud ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste (100 aa) põhjal koostatud 2008. ja 2009. aasta proovivõtupunktide summaarsed akumulatsioonigraafikud (*Cutoff*-väärtus 82%).

2008. ja 2009. aasta proovivõtupunktide akumulatsioonigraafikutelt (Joonis 3) on näha, et C proovivõtupunkti (Narva laht) klooniraamatukogust on mõlemal aastal leitud teiste proovivõtupunktidega võrreldes kõige rohkem erinevaid AlkB järjestusi. Seda võib seletada proovivõtupunkti asukohaga, mis on 2 km kaugusel Narva jõe suudmest ning kuhu jõuavad ka väiksemad Ida-Virumaa põlevkivi kaevanduspiirkondi läbinud jõed, mis võivad tuua endaga kaasa saastunud vett. Proovivõtupunkti C suurem mitmekesisus võib olla tingitud ka merevee madalamast soolsusest (3,7-4,1‰) võrreldes teiste proovivõtupunktidega (5,3-6,3‰) (Tabel 2). Nimelt on näidatud, et kindlate bakterirühmade, nagu *Vibrio* ja *Actinobacteria*, arvukus on seotud kasvukeskkonna soolsuse ja toitainesisaldusega (Eiler *et al.*, 2006; Holmfeldt *et al.*, 2009). Merevee soolsuse ja kaheksa klooniraamatukogu erinevate ning ka teoreetiliselt võimalike ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste arvude vahel leiti statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ) negatiivne seos regressioonikordajatega vastavalt -0,888 ja -0,848. See negatiivne seos väljendab, et näiteks madala soolsuse korral on võimalik leida rohkem erinevaid AlkB järjestusi ja vastupidi.

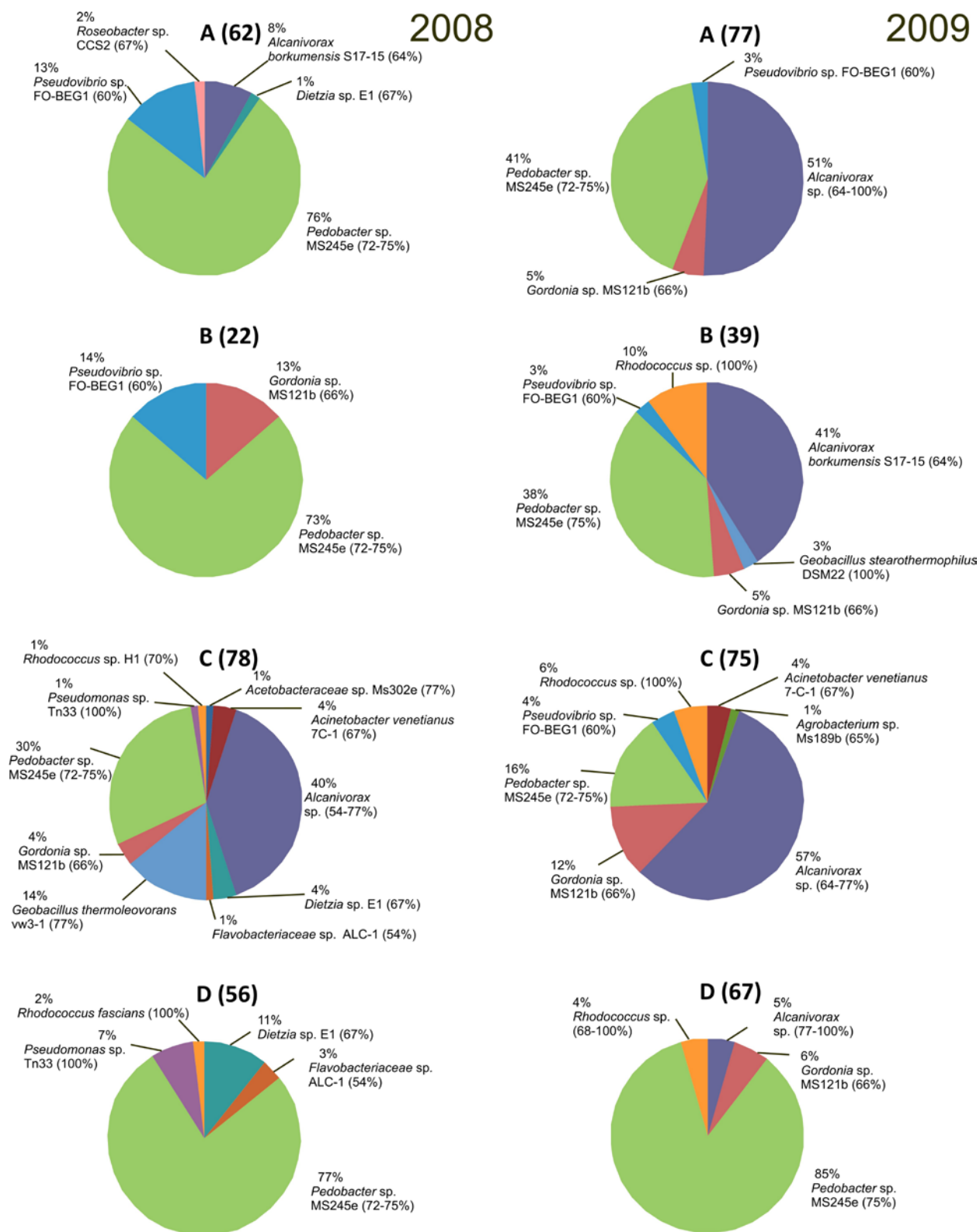
### 2.3.3. AlkB järjestuste fülogeneetiline analüüs

Nii 2008. kui ka 2009. aasta klooniraamatukogu esinduskloonide (Lisa 2) sekveneeritud järjestustest saadud ennustatud AlkB aminohappelistest järjestustest ja referentstüvede vastavatest AlkB järjestustest koostati Mega5.2 programmi kasutades lähimsideme meetodil fülogeneetiline puu (Joonis 4). 30 erinevat ennustatud AlkB aminohappelist järjestust klasterduvad fülogeneesipuul seitsmeks erinevaks klasteriks, millest 3 klasterdub gramnegatiivsetest bakteritest (GN) leitud AlkB klasteritega, mis jaotuvad veel omakorda *Proteobacteria* klaster (III), *Gammaproteobacteria* klaster (VII) ja gramnegatiivsete bakterite klaster (I). Lisaks on 2 nn. segaklastrit, IV ja VI, kus saadud AlkB järjestused klasterduvad nii gramnegatiivsetest kui ka grampositiivsetest bakteritest (GP) leitud AlkB järjestustega. Klaster V moodustavad kloonid ja ainult grampositiivsetest bakteritest leitud AlkB järjestused, ning klaster II kuuluvate kloonide AlkB järjestused omavad lähimaid vasteid, vaid erinevate mittekultiveeritavate kloonide AlkB klasteritega (Joonis 4).



2008. aasta kui 2009. aasta proovivõtupunktide klooniraamatukogudest leitud ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste (100 aa) hulgas oli kõige suurem osakaal, vastavalt 87% ja 88% kõikidest kloonidest, gramnegatiivsetest bakteritest leitud AlkB järjestustel (Joonis 5, LISA 2). Hõimkonna tasemel saadi GeneBank andmebaasist AlkB järjestustele vasteid *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ja *Proteobacteria* esindajate AlkB järjestustega (LISA 2). 2008. aasta klooniraamatukogudest moodustasid kõige suurema osa kloonid (133), mille AlkB järjestused olid 54-75% identsed hõimkonna *Bacteroidetes* esindajate AlkB järjestustega. Samas 2009. aasta klooniraamatukogudes oli enam vähem võrdne osa kloone 72-75% identsed hõimkonna *Bacteroidetes* (116 klooni) ja hõimkonna *Proteobacteria* (110 klooni) esindajate AlkB järjestustega. Mõlema aasta klooniraamatukogudes oli kõige väiksem osakaal kloonidel, mille järjestused olid 77-100% identsed hõimkonna *Firmicutes* esindajate AlkB järjestustega (LISA 2). Kirjanduse andmetel leidub kõikides nimetatud hõimkondades baktereid, kes on võimelised lagundama erinevaid süsivesinikke (Prince *et al.*, 2010).

Mõlema aasta veeproovidest eraldatud DNAlt amplifitseeritud *alkB* geeni klooniraamatukogudest leitud ennustatavad AlkB aminohappelised järjestused andsid GeneBank andmebaasis vasteid hõimkondadesse *Alphaproteobacteria* (perekonnad: *Pseudovibrio*, *Roseobacter* ja *Agrobacterium*), *Gammaproteobacteria* (*Alcanivorax*, *Acinetobacter*, *Acetobacteraceae* ja *Pseudomonas*), *Flavobacteria* (*Flavobacteriales*), *Sphingobacteria* (*Pedobacter*) *Actinobacteria* (*Rhodococcus*, *Gordonia* ja *Dietzia*) ning *Firmicutes* (*Bacilli*) kuuluvate bakterite AlkB järjestustega (Joonis 4, Joonis 5, LISA 2).



**Joonis 5.** 2008 ja 2009. aasta *alkB* klooniraamatukogudes esinevate kloonide osakaalud (%) proovipunktide lõikes. Iga sektor juurde on kirjutatud ka kloonirühma (*Cutoff*=82%) esindaja AlkB järjestusele GeneBank andmebaasi otsingu tulemusel leitud lähimat AlkB järjestust kandva kultiveeritava bakteri nimi, millele järgneb sulgudes identsusprotsent. Iga proovivõtupunkti järel on sulgudes kirjas antud klooniraamatukogu suurus.

### 2.3.3.1. Domineerivate kloonirühmade ennustatavate *AlkB* järjestuste analüüs

2008. aasta C proovivõtupunkti ja 2009. aasta A, B ning C proovivõtupunktide analüüsitud kloonidest moodustasid kõige suurema osakaalu (vastavalt 40, 51, 41 ja 57 %) perekonna *Alcanivorax* erinevatest liikidest pärinevate *AlkB* järjestusega sarnaseid järjestusi (identsus 57-100%) omavad kloonid (Joonis 5, LISA 2). Perekonna *Alcanivorax* erinevate tüvede *AlkB* referentsjärjestused paiknevad fülogeneetilisel puul klasterites I, III, V ja VI (Joonis 4). Kirjanduses on näidatud, et perekonna *Alcanivorax* esindajate arvukus suureneb märgatavalt kui keskkonda on sattunud naftasaadusi (Harayama *et al.*, 2004). Perekonda *Alcanivorax* kuuluvad bakterid on võimelised lagundama peale lineaarse ahelaga alkaanide ka hargnenud ahelaga alkaane ning arvatakse, et just see võimaldab neil domineerida toornafta reostusega vees (Hara *et al.*, 2003). Seega perekonna *Alcanivorax* esindajatele sarnaste *AlkB* järjestuste domineerimine nendes proovivõtupunktides võiks viidata õlireostuse esinemisele.

Uuemates Läänemere mikroobikoosluse mitmekesisust (16S rRNA järjestuste analüüsil põhinevates) uurivates töodes on näidatud, et perekonna *Alcanivorax* esindajate arvukus kooslustes on väike ning domineeriv on hoopis perekond *Pseudomonas* (Koskinen *et al.*, 2011; Viggor *et al.*, 2013). Vilsandi saare lähedalt võetud naftasaadusi sisaldavates veeproovi mikrokosmikateses põhjendati *Alcanivorax*'i kui tavalise merebakteri liikide väikest osakaalu mitte sobivate kasvutingimustega (Viggor *et al.*, 2013). Läänemere kui riimveelise veekogu soolsus ei ole nii kõrge kui teistel maailma meredel ning antud töös viidi mikrokosmikatsed läbi madalal temperatuuril (15 °C) ega kasutatud *Alcanivorax* liikide kasvuks vajalike lisatoitainete (lämmastik ja fosfor), mistõttu koosluse *alkB* klooniraamatukogus ning *alkB* geenifragmendi DGGE profiilidelt leiti enam pseudomonaadide *alkB* geeni järjestustega sarnaseid järjestusi. Samas on kirjanduses näidatud, et bakteri *Alcanivorax borkumensis* SK2 *alkB1* geen on nii järjestuselt kui ka geenide organisatsioonilt väga sarnane *Pseudomonas putida* GPO1 ja *Pseudomonas putida* P1 geeniklastritega. Kusjuures nende klastrite G+C-sisaldus on märkimisväärselt väiksem kui ülejäänud *P. putida* tüve P1 genoomil, mis lubab oletada, et ilmselt on *alk* geenid omandatud horisontaalse geeniülekanne teel (van Beilen *et al.*, 2001, van Beilen *et al.*, 2003). Seega tuleks antud juhul suhtuda ennustatavate *AlkB* aminohappeliste järjestuse seostamisel kindla bakteriperekonna *AlkB* järjestusega kriitiliselt ning edaspidistes töodes võiks uurida ka kultiveeritavate bakterite *AlkB* mitmekesisust.

2008. aasta A, B, D proovivõtupunktidest ja 2009. aasta D proovivõtupunktist saadud ennustatavatest AlkB aminohappelistest järjestustest kõige suurema osakaalu (vastavalt 76, 73, 77 ja 85 %) moodustasid kloonid, mis olid sarnased perekonna *Pedobacter* sp. MS245e ühe AlkB homoloogi järjestustega (identsus 72-75%) (Joonis 5, LISA 2). Fülogeneetilisel puul klasterduvad bakterist *Pedobacter* sp. MS245e leitud AlkB homoloogide järjestused kahte klastrisse: GP ja GN segaklastrisse IV ja GN klastrisse I (Joonis 4). Perekond *Pedobacter* esindajaid on veel vähe uuritud, kuid on näidatud nende võimet lagundada aromaatsid ja alifaatsid süsivesinikke (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010; Vázquez *et al.*, 2013). *Pedobacter* kuulub hõimkonda *Bacteroidetes*, mis on 16S rRNA meetoditel põhinevate uurimustööde andmetel kõige domineerivam hõimkond Läänemere mikroobikooslustes (Pinhassi *et al.*, 1997; Riemann *et al.*, 2008).

Fülogeneetilisel puul klasterduvad kõige suurema kloonirühma esinduskloonide AlkB järjestused ühte rühma gramnegatiivsetest bakteritest, *Pedobacter* MS245e ja *Agrobacterium* sp. MS189b, leitud erinevate AlkB homoloogide ning grampositiivse bakteri *Prauserella rugosa* AlkB järjestustega (klaster IV, Joonis 4). Kuna alles 2012. aastal on lisatud *Pedobacter* MS245e AlkB järjestused GeneBank andmebaasi, siis leidis Riinu Kiiker (Kiiker, 2010) et 2008. aasta proovivõtupunktide *alkB* klooniraamatukogudes domineerisid *Prauserella rugosa* AlkB järjestustega sarnased kloonid. Samas on saadud AlkB järjestuste identsusprotsendid nendes kahes perekonnas kirjeldatud AlkB järjestustel väga sarnased, vastavalt *Pedobacter*'i AlkB järjestusega 72-78% ja *Prauserella rugosa* AlkB järjestusega identsus 70-78%. Siit tekib jälle küsimus, kas on õige seostada saadud AlkB järjestust konkreetse bakteriperekonnaga? Nii selles uurimustöös koostatud fülogeneetilisel puul (Joonis 4) kui ka kirjanduses (Giebler *et al.*, 2013) on näidatud, et erinevad perekonna *Pedobacter*'i AlkB järjestused klasterduvad puul väga erinevatesse klastritesse (Joonis 4), mis näitab veelkord, et alati ei ole võimalik seostada antud AlkB järjestuse leidmist kindla perekonna, vaid on võimalik oletada, et saadud järjestus on antud perekonna AlkB järjestusega sarnane.

#### **2.3.3.2. Grampositiivsete bakterite ennustatavate AlkB järjestustele sarnaste *alkB* kloonirühmade analüüs**

Mõlema aasta klooniraamatukogudest leiti kõige vähem ennustatavaid AlkB aminohappelisi järjestusi, mis olid sarnased erinevate GP bakteriperekondade *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Geobacillus* ja *Dietzia* esindajate AlkB järjestustega (identsus 66-100%; Joonis 5, Lisa2).



Nimetatud bakteriperekondadest leitud AlkB referentsjärjestused on fülogeneetilisel puul rühmitunud klastrisse V, vaid osad bakteri *Geobacillus* tüvede AlkB homoloogid klasterduvad GN ja GP bakterite AlkBde segaklastrisse (Joonis 4).

Nii 2008. kui ka 2009. aasta proovivõtupunktidest saadi kokku 25 AlkB järjestust, mis olid 66% identsed *Gordonia* sp. MS121b AlkB järjestustega (Joonis 5, LISA 2). Erinevad *Gordonia* tüved on võimelised lagundama propaani, kasutades selleks propaani monooksügenaasi (Kotani *et al.*, 2003), kuid omavad ka *alk* geene, mis võimaldavad C<sub>12</sub> kuni C<sub>36</sub> alkaanide kasutamist ainsa süsinikuallikana (Lo Piccolo *et al.*, 2010).

Perekonna *Rhodococcus* AlkB järjestustega sarnaseid AlkB (identsus 68-100%) järjestusi saadi 2009. aasta proovivõtupunktidest (12 järjestust) rohkem kui 2008. aasta proovivõtupunktidest (1 järjestus) (Joonis 5, LISA 2). Aktinomütsetide hulka kuuluva *Rhodococcus*'e puhul on tegemist väga mitmekesise degradatiivse potentsiaaliga bakteriga, kelle domineerimist saasteainete lagundajana erinenavates bioremediatsioonikatsetes on näidatud väga mitmekesistel keskkonnatingimustel, nagu kõrge pH ja madal temperatuur (Larkin *et al.*, 2010). Soome lahe proovivõtupunkti veeproovi pH oli 2009. aastal, kui klooniraamatukogust leiti kõige enam perekonna *Rhodococcus* AlkB järjestustele sarnaseid AlkB järjestusi (Joonis 5, Lisa 2), teiste proovivõtupunktidega võrreldes kõige kõrgem (Tabel 2). Seega võib oletada, et kõrgem pH võimaldab perekonna *Rhodococcus*'e esindajatel olla konkurentsivõimelisemad ebasoodsates keskkonnatingimustes.

Ainult 2008. aasta proovivõtupunktide C ja D klooniraamatukogudest leiti AlkB järjestusi (10), mis on 67% identsed perekonna *Dietzia* AlkB järjestustega (Joonis 5, LISA 2). Perekonna *Geobacillus* AlkB järjestusega sarnaseid AlkB kloone saadi 2008. aasta C ja 2009. aasta B proovivõtupunktide raamatukogudest vastavalt 11 (identsus 100%) ja 1 (identsus 77%) (Joonis 5, LISA 2). *Geobacillus* erinevad liigid lagundavad kõrgetel temperatuuridel (>40 °C) alkaane, mille paremaks kättesaamiseks keskkonnast toodavad nad pindaaktiivseid aineid, mistõttu on nad biotehnoloogiliselt väga huvitavad (Marchant ja Banat, 2010). Need GP bakteriperekonnad kuuluvad hõimkonda *Actinobacteria*, mille erinevate liikide esinemist on näidatud ka Läänemere mikroobikooslustes (Riemann *et al.*, 2008; Holmfeldt *et al.*, 2009; Koskinen *et al.*, 2011; Viggor *et al.*, 2013). Hõimkonda *Firmicutes* kuuluva perekonna *Geobacillus* esindajate AlkB järjestustega sarnased AlkB järjestused on ainukesed (Joonis 5, LISA 2), mida antud uurimustöös sellest hõimkonnast tuvastati. Hõimkonda *Firmicutes*

kuuluvaid bakteriperekondi on väikese osakaaluga leitud ka Läänemerest (Riemann *et al.*, 2008).

### ***2.3.3.3. Teiste gramnegatiivsete bakterite ennustatavate AlkB järjestustele sarnaste alkB kloonirühmade analüüs***

Gramnegatiivsete bakteriperekondade *Alcanivorax* (klass *Gammaproteobacteri*) ja *Pedobacter* (klass *Sphingobacteria*) ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestustega sarnased AlkB aminohappelistest järjestused moodustasid uuritud klooniraamatukogudest kõige suurema osa. Samas on süsivesinikke lagundavaid bakteriperekondi kirjeldatud väga suurest hõimkonnast *Proteobacteria* (Prince *et al.*, 2010), mille kahe klassi *Alphaproteobacteria* ja *Gammaproteobacteria* esindajate AlkB aminohappeliste järjestustele sarnaseid ennustatavaid AlkB aminohappelisi järjestusi leiti ka antud uurimustöös, kuid nende osakaalud klooniraamatukogudes olid märgatavalt väiksemad (Joonis 4, Joonis 5, LISA 2). Kui *Alphaproteobacteria* klassi kuuluva perekonna *Pseudovibrio* AlkB järjestustele sarnaseid (identsus 60%) järjestusi (17 kloon) leiti mõlema aasta proovivõtupunktide raamatukogudest (Joonis 5, LISA 2), siis samasse klassi kuuluvate *Roseobacter* sp. CCS2 (identsus 67%) ning *Agrobacterium* sp. MS189b (identsus 65%) AlkB järjestusega sarnane järjestus leiti vastavalt ainult 2008. aasta A ning 2009. aasta C proovi kloonide hulgest. Erinevatel *Pseudovibrio*, *Agrobacterium* ja *Roseobacter* tüvedel on näidatud võimet lagundada alkaane ning viimati nimetatud tüvedel ka PAH lagundamise võimet (de Souza *et al.*, 1998; Buchan ja González, 2010; Rizzo *et al.*, 2013). Vilsandi rannikuala veeproovi diiselikütuse ja põlevkiviõliga mikrokosmikatsetest tuvastati koosluse DNAlt amplifitseeritud 16S rRNA DGGE profiilidel perekonna *Roseobacter* sarnaste geenifragmentide domineerimine (Viggor *et al.*, 2013). Perekonda *Roseobacter* kuuluvate tüvede domineerimine leiti ka mikrokosmikatsetes, kus mereveele oli lisatud hargnenud ahelaga alkaane (McKew *et al.*, 2007). See näitab, et tüüpiline merebakteri perekond *Roseobacter* on väga mitmekesise metabolismiga ning oluline naftareostuse vähendaja.

Fülogeneetilisel puul klasterduvad perekondade *Pseudovibrio*, *Agrobacterium* ja *Roseobacter* referentstüvede AlkB järjestused erinevatesse klastritesse (I, II ja III; Joonis 4), kusjuures *Agrobacterium* sp. MS189b erinevad AlkB homoloogid ei klasterdu ühte klastrisse. Kõikide antud kloonide AlkB järjestuste identsused referentstüvede AlkB järjestustega on madalad (60-67%), mis lubab arvata, et saadud AlkB järjestused on seni tundmata ja selliseid *alkB* geene kandvaid mikroobe pole veel kirjeldatud.

Klassi *Gammaproteobacteria* perekondade *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ja *Acetobacteraceae* esindajate AlkB järjestustega sarnased AlkB järjestused (identsused vastavalt 100, 67 ja 77%) olid klooniraamatukogudes (2008. aasta C ja D ning 2009. aasta C proovis) esindatud vaid 1 kuni 5 klooniga (Joonis 5, LISA 2). Samas on näidatud, et *Acinetobacter* ja *Pseudomonas* tüved lagundavad väga varieeruva pikkusega süsivesinikke, nii lühikese-, pika- kui ka hargnenud ahelaga alkaane ning erinevaid aromaatsid ühendeid (Lal ja Khanna, 1996; Thangaraj *et al.*, 2008; Kostka *et al.*, 2011; Heipieper *et al.*, 1994; Wery ja De Bont, 2004). Ka Vilsandi proovivõtupunktist võetud veeproovi mikrokosmikatsede 16S rRNA ja *alkB* geeni põhised analüüsid näitasid *Gammaproteobacteria* hõimkonna esindajate olulist rolli Läänemere alkaane lagundava mikroobikoosluse kujunemisel (Viggor *et al.*, 2013).

Perekonnaga *Pseudomonas* sarnased AlkB järjestused klasterdusid fülogeneetilisel puul klastrisse V ja perekonnaga *Acetobacteraceae* sarnased AlkB järjestused klastrisse III (Joonis 4). Samas kui perekonna *Acinetobacter* ja ka osad *Alvanivorax* AlkB järjestustele sarnaste, enamasti vaid üksikute kloonidega esindatud madala identsusprotsendiga (54-67%) AlkB järjestusega kloonid rühmituvad fülogeneetilisel puul omaette klastrisse (II) koos GeneBank andmebaasist saadud mittekultiveeritavate kloonide AlkB järjestustega (Joonis 4). Antud AlkB järjestuste madal identsus referentstüvedega lubab oletada, et selles kloonide klastris esinenud AlkB järjestused on samuti tõenäoliselt senini tundmatud järjestused, mida pole veel kultiveeritavates tüvedes täpsemalt uuritud.

Antud töös analüüsitud AlkB järjestuste ja referentsjärjestuste alusel koostatud fülogeneetilisel puul on näha, et sama perekonna (näiteks *Alcanivorax*, *Agrobacterium*, *Pedobacter*) esindajate AlkB järjestused ei klasterdu alati samasse gruppi (Joonis 4) ja seega ei saa leitud klooni AlkB järjestust üks ühele seostada BLAST-i otsingumootori abil leitud referentsjärjestust kandva tüve fülogeneetilise kuuluvusega. Hiljutises uurimustöös on näidatud, et perekondade *Rhodococcus* ja *Pseudomonas* alkaane lagundavatel liikidel võib ühes tüves olla mitu väga erineva järjestustusega *alkB* geeni (Giebler *et al.*, 2013). Erinevad uurimustööd, mis analüüsivad AlkB järjestuste mitmekesisust, oletavad, et *alkB* geenijärjestuste klasterdumine erinevatesse klastritesse tuleneb AlkB substraadispetsiifilisusest mitte fülogeneetilisest päritolust (van Beilen *et al.*, 2003; Heiss-Blanquet *et al.*, 2005).

Koostatud akumulatsioonigraafikute põhjal saab öelda, et mõlema aasta klooniraamatukogud on piisavalt iseloomustatud. Kõige mitmekesisem ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste poolest on mõlemal aastal Narva lahe (C) proovivõtupunkt, mis võis olla põhjustatud antud proovivõtu madalamast soolsusest ning asukohast. Leitud ennustatavatest AlkB aminohappelistest järjestustes suurema osa olid sarnased gramnegatiivsete bakterite hõimkondade *Bacteroidetes* ja *Proteobacteria* esindajate AlkB aminohappeliste järjestustega (Joonis 4, Joonis 5, LISA 2). Need on hõimkonnad, kust on peamiselt leitud süsivesinikke lagundavaid baktereid (Prince *et al.*, 2010) ning mida on kirjeldatud Läänemere mikroobikoosluses (Pinhassi *et al.*, 1997; Riemann *et al.*, 2008; Viggor *et al.*, 2013). Mõlema aasta proovivõtupunktidest leiti AlkB järjestusi, mida on kirjeldatud bakterites, kes lagundavad nii lineaarseid, tsüklilisi kui ka aromaatsed ühendeid.

# KOKKUVÕTE

Toornafta, mis peamiselt koosneb alkaanidest, kujutab endast ohtu Läänemere elustikule. Läänemere mitmekesisuse säilitamiseks otsitakse lahedusi, kuidas naftareostusega seotud riske maandada ja võimalikke tagajärgi neutraliseerida. Erinevatel mikroorganismidel on võime kasutada alkaane süsiniku- ja energiaallikana ning seega saab neid rakendada toornaftast tingitud reostuse kõrvaldamiseks keskkonnast. Läänemere mikroobikoosluse alkaanide lagundamise potentsiaali uurimiseks tuleks uurida alkaanide lagundamise võtmeensüümide, alkaani hüdroksülaaside, mitmekesisust.

Selle bakalaureusetöö eesmärgiks oli analüüsida ja võrrelda *alkB* geeni, kui ühe enam uuritud alkaani hüdroksülaasi, klooniraamatukogude põhjal 2008. ja 2009. aastal võetud nelja Läänemere veeproovipunkti AlkB mitmekesisust. Käesolevas bakalaureusetöös koostatud ja täiendatud klooniraamatukogud on piisavalt iseloomustatud ning saadud AlkB järjestuste analüüsil tehti järgnevad järeldused:

- mõlema aasta proovivõtupunktide klooniraamatukogudest leitud ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste hulgas oli kõige suurem osakaal, vastavalt 87% ja 88% kõikidest kloonidest, gramnegatiivsetest bakteritest leitud AlkB järjestustel;
- erinevad ennustatavad AlkB aminohappelised järjestused olid peamiselt sarnased kas perekonna *Alcanivorax* esindajate AlkB järjestustega (identsus 57-100%) või perekonna *Pedobacter* esindajate AlkB järjestustega (identsus 72-75%);
- erinevate ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste poolest oli nii 2008. kui ka 2009. aastal kõige mitmekesisem Narva lahe (C) proovivõtupunkt, mille võis põhjustada teistest proovivõtupunktidest madalam soolsus ja asukoht tööstuspiirkonna läheduses;
- koostatud fülogeneetilisel puul moodustasid eraldi klatri vaid klooniraamatukogudest leitud AlkB järjestused;
- mõlema aasta kõikide proovivõtupunktide *alkB* geeni klooniraamatukogudest leiti AlkB järjestusi, mida on kirjeldatud bakterites, kes lagundavad nii lineaarseid, tsükliilisi kui ka aromaatsid ühendeid.

Antud bakalaureusetöö tulemused näitavad, et Läänemere mikroobikoosluse AlkB järjestused on mitmekesised, mis lubab oletada, et uuritud proovivõtupunktide mikroobikoosluste

alkaanide lagundamise potentsiaal on hea. Selleks, et saada veel põhjalikumat teavet võiks edaspidi uurida kultiveeritavate bakterite AlkB süsteeme ning koostada ja analüüsida ka teisi alkaani hüdroksülaasi geenide (CYP153, AlmA, BMO, MMO jne) klooniraamatukogusid.

## Comparison of the diversity of AlkB sequences in Baltic Sea based on the *alkB* clone libraries of 2008 and 2009

Liis Pärnpuu

### SUMMARY

The Baltic Sea is the second largest brackish water basin in the world with its own unique ecosystem. Also, it is considered to be one of the most polluted sea that is constantly threatened by oil spills. Crude oil is a mixture of organic compounds, such as alkanes, cycloalkanes and aromatic compounds. There is possibility to use microbes in the degradation of oil contamination due to the bacteria's ability to use hydrocarbons as source of carbon or energy. Bacteria have special enzymes, alkane hydroxylases, for degradation of alkanes. The most well known and described enzyme of that group is membrane-bound alkane hydroxylase (AlkB) that is encoded by the *alkB* gene.

The aim of this study was to characterize and compare the diversity of *alkB* gene clone libraries in four different sampling points of the Baltic Sea. According to accumulation curves, the composed *alkB* clone libraries were described sufficiently. Following conclusions were made based on results of analyses:

- in both years, most of the predicted AlkB sequences were similar (identity 87% - in year 2008, 88% - in year 2009) to the AlkB sequences obtained from gramnegative bacteria;
- in both years, the most diverse *alkB* clone library was from sampling point Narva Bay (C) due to the lower salinity and the location near to industrial zone;
- predicted AlkB sequences were mostly similar to the AlkB sequences from genus *Alcanivorax* (identity 57-100%) or to the AlkB sequences from genus *Pedobacter* (identity 72-75%);
- AlkB sequences that were found only in clone libraries, composed separate cluster in phylogenetic tree;
- in both years and in all sampling points, there were found AlkB sequences that are characterized in microbes who are able to degrade linear, cyclic and aromatic compounds.

The results of the current bachelor's thesis show that very diverse AlkB sequences are present in the Baltic Sea. Therefore, the potential of degrading alkanes in the microbial communities of the Baltic Sea is good. For future perspective, the culture based analyses of *alkB* gene should be done to get more information about the AlkB functionality in these Baltic Sea sampling points. Also, it is good idea to characterize and identify other alkane hydroxylase genes (CYP153, AlmA, BMO, MMO etc.) in order to examine these sampling points more thoroughly.



## KASUTATUD KIRJANDUS

- Ashraf, W., Mihdhir, A., Murrell, J. C. (1994). Bacterial oxidation of propane. *FEMS. Microbiol. Lett.* **122**: 1–6.
- Atlas, R. M. ja Bartha, R. (1972). Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol. Bioeng.* **14**: 309–318.
- Austin, R. N., Chang, H-K., Zylstra, G. J., Groves, J. T. (2000). The non-heme diiron alkane monooxygenase of *Pseudomonas oleovorans* (AlkB) hydroxylates via a substrate radical intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 11747–11748.
- Baptist, J. N., Gholson, R. K., Coon, M. J. (1963). Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system: I Products of octane oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* **69**: 40-47.
- Bertrand, E., Sakai, R., Rozhkova-Novosad, E., Moe, L., Fox, B. G., Groves, J. T., Austin, R. N. (2005). Reaction mechanisms of non-heme diiron hydroxylases characterized in whole cells. *J. Inorg. Biochem.* **99**: 1998–2006.
- Britton, L. N. 1984. Microbial Degradation of Aliphatic Hydrocarbons, p. 82-129. In D.T. Gibson (ed.), *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Boulton, C. A., ja Ratledge, C. (1984). The Physiology of Hydrocarbon-Utilizing Microorganisms. *Top. Enzyme. Ferment. Biotechnol.* **9**: 11-77.
- Buchan, A. ja González, J. M. 2010. *Roseobacter*, p. 1336–1343. In K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, vol 3. Berlin Heidelberg. Springer.
- Burland, S. M. ja Edwards, E. A. (1999). Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 529–533.
- Coon, M. J. (2005). Omega-oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**: 378–385.
- Coulon, F., McKew, B. A., Osborn, A. M., McGenity, T. J., Timmis, K. N. (2007). Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environ. Microbiol.* **9**: 177–186.
- Dubbels, B. L., Sayavedra-Soto, L. A., Arp, D. J. (2007). Butane monooxygenase of ‘*Pseudomonas butanovora*’: purification and biochemical characterization of a terminal-alkane hydroxylating diiron monooxygenase. *Microbiology.* **153**: 1808–1816.

- Dubbels, B. L., Sayavedra-Soto, L. A., Bottomley, P. J., Arp, D. J.** (2009). *Thauerabutanivorans* sp. nov., a C2–C9 alkane-oxidizing bacterium previously referred to as ‘*Pseudomonas butanovora*’. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 1576–1578.
- Dybern., B. I. ja Fonselius., S. H.** 1981. Pollution, p. 351–382. *In* A. Voipio (ed.), The Baltic Sea, *Elsevier Oceanography Series*, Amsterdam, the Netherlands
- Edwards, E. A, Wills, L. E., Reinhard, M., Grbi’c-Gali’c, D.** (1992). Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 794–800.
- Eiler, A., Johansson, M., Bertilsson, S.** (2006). Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl. Environ. Microb.* **72**: 6004–6011.
- Feitkenhauer, H., Müller, R., Märkl, H.** (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 6070°C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation.* **14**: 367–372.
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., Tang, Y., Liu, X., Han, W., Peng, X., Liu, R., Wang, L.** (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 5602-5607.
- Giebler, J., Wick, L. Y., Schlöter, M., Harms, H., Chatzinotas, A.** (2013). Evaluating the assignment of *alkB* T-RFs and sequence types to distinct bacterial taxa. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.04028-12
- Golyshin, P. N., Martins Dos Santos, V. A., Kaiser, O., Ferrer, M., Sabirova, Y. S., Lunsdorf, H., Chernikova, T. N., Golyshina, O. V., Yakimov, M. M., Pühler, A., Timmis, K. N.** (2003). Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. *J. Biotechnol.* **106**: 215–220.
- Golyshin, P. N., Ferrer, M., Chernikova, T. N., Golyshina, O. V., Yakimov, M. M.** 2010. *Oleispira*, p. 1755–1763. *In* K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, vol 3. Berlin Heidelberg. Springer.
- Green, J. ja Dalton, H.** (1989). Substrate specificity of soluble methane monooxygenase. Mechanistic implications. *J. Biol. Chem.* **264**: 17698–17703.
- Guibert, L. M., Loviso, C. L., Marcos, M. S., Commendatore, M. G., Dionisi, H. M., Lozada, M.** (2012). Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microbiol. Ecol.* **64**: 605–16.

- Hagström, Å., Pinhassi, J., Zweifel, U. L.** (2000). Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat. Microbiol. Ecol.* **21**(3): 231–44.
- Hakemian, A. S. ja Rosenzweig, A.C.** (2007). The biochemistry of methane oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 223–241.
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C., Fox, H. E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H. S., Madin, E. M., Perry, M. T., Selig, E. R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R.** (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science.* **319**: 948–952.
- Halsey, K. H., Sayavedra-Soto, L. A., Bottomley, P. J., Arp, D. J.** (2006). Site directed amino acid substitutions in the hydroxylase a subunit of butane monooxygenase from *Pseudomonas butanovora*: implications for substrates knocking at the gate. *J. Bacteriol.* **188**: 4962-4969.
- Hamamura, N., Yeager, C. M., Arp, D. J.** (2001). Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides* sp. strain CF8. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4992-4998.
- Hanson, R. S. ja Hanson, T. E.** (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439–471.
- Hara, A., Syutsubo, K., Harayama, S.** (2003). *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ. Microbiol.* **5**: 746-753.
- Hara, A., Baik, S. H., Syutsubo, K., Misawa, N., Smits, T. H. M., van Beilen, J. B., Harayama, S.** (2004). Cloning and functional analysis of alkB genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Env. Microbiol.* **6**: 191-197.
- Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A.** (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 205-214.
- Head, I. M., Jones, D. M., Roling, W. F.** (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 173-182.
- Heipieper, H. J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H., De Bont, J. A. M.** (1994). Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends. Biotechnol.* **12**: 409–414.
- Heiss-Blanquet, S., Benoit, Y., Marechaux, C., Monot, F.** (2005). Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 1392–1403.
- HELCOM** (Helsinki Commission. Baltic Marine Environment Protection Commission). Overview of the shipping traffic in the Baltic Sea, update April 2009. Available online: [http://www.helcom.fi/shipping/navigation/en\\_GB/navigation](http://www.helcom.fi/shipping/navigation/en_GB/navigation)

- Holmfeldt, K., Dziallas, C., Titelman, J., Pohlmann, K., Grossart, H. P., Riemann, L.** (2009). Diversity and abundance of freshwater *Actinobacteria* along environmental gradients in the brackish northern Baltic Sea. *Environ. Microbiol.* **11**: 2042–2054.
- Hölldors, G., Niemi, A., Ackefors, H., Lassing, J., Leppäkowski, E.** 1981. Biological oceanography, p. 219–74. In A. Voipio (ed.), The Baltic Sea, *Elsevier Oceanography Series*, Amsterdam, the Netherlands
- Hyne, N. J.** 2001. Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and production. p. 1–14 2<sup>nd</sup> edition Oklahoma PennWell Corporation
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**: 23–28.
- Jahng, D. ja Wood, T. K.** (1996). Metal ions and chloramphenicol inhibition of soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 744–749.
- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., Bartlam, M.** (2013). Structural insights into diversity and *n*-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.* **4**: 58.
- Johnson, E. L. ja Hyman, M. R.** (2006). Propane and *n*-butane oxidation by *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 950–952.
- Kasai, Y., Kishira, H., Harayama, S.** (2002). Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in marine environment. *Appl. Environ. Microb.* **68**: 5625–5633.
- Kemp, P. F. ja Aller, J. Y.** (2004). Estimating prokaryotic diversity: when are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol. Oceanogr. Methods*. **2**: 114–125.
- Kester, A. S. ja Foster, J. W.** (1963). Diterminaloxidation of long-chain alkanes by bacteria. *J. Bacteriol.* **85**: 859–869.
- Kiiker, R.** (2010). Membraanseoselist alkaani hüdroksülaasi kodeeriva *alkB* geeni mitmekesisus Läänemeres. Bakalaureusetöö. *Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut*
- Kloff, S. ja Wicks, C.** 2004. Environmental management of offshore oil development and maritime oil transport, p. 52. IUCN Commission on Environmental, Economic and Social Policy.
- Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T. C., Huettel, M.** (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 7962–7974.

- Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N.** (2003). Propane monooxygenase and NAD<sup>+</sup>-dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp. strain TY-5. *J. Bacteriol.* **185**: 7120–7128.
- Kotani, T., Kawashima, Y., Yurimoto, H., Kao, N., Sakai, Y.** (2006). Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7. *J. Biosci. Bioeng.* **102**: 184-192.
- Kuhn, E., Bellicanta, G. S., Pellizari, V.** (2009). New *alk* genes detected in Antarctic marine sediments. *Environ. Microbiol.* **11**: 669–673.
- Lal, B. ja Khanna, S.** (1996). Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 355–362.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A., Allen, C. C. R.** 2010. *Rhodococcus*, p. 1840-1842. In K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo. (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, vol 3. Berlin Heidelberg. Springer.
- Lehtonen, K. K., ja Schiedek, D.** (2006). Monitoring biological effects of pollution in the Baltic Sea: Neglected – but still wanted? *Elsevier. Marine. Pollution. Bulletin* **53**: 377-386
- Li, Z., Feiten, H. J., Chang, D., Duetz, W. A., van Beilen, J. B., Witholt, B.** (2001). Preparation of (R)- and (S)-N protected- 3-hydroxypyrrolidines by hydroxylation with *Sphingomonas* sp. HXN-200, a highly active, Regio-and Stereoselective, and easy to handle biocatalyst. *J. Org. Chem.* **66**: 8424-8430.
- Li, L., Liu, X., Yang, W., Xu, F., Wang, W., Feng, L., Bartlam, M., Wang, L., Rao, Z.** (2008). Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *J. Mol. Biol.* **376**: 453-465.
- Lieberman, R. L. ja Rosenzweig, A. C.** (2004). Biological methane oxidation: regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**: 147-164.
- Liu, C. L., Wang, W. P., Wu, Y. H., Zhou, Z. W., Lai, Q. L., Shao, Z. Z.** (2011). Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Environ. Microbiol.* **13**: 1168–1178.
- Lo Piccolo, L., de Pasquale, C., Fodae, R., Pugila, A. M., Quatrini, P.** (2011). Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. Strain SoCg in degradation of solid *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(4): 1204-13.
- Lovley, D. R., Woodward, J. C., Chapelle, F.H.** (1994). Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature.* **370**: 128–131.
- Lovley, D. R., Woodward, J. C., Chapelle, F. H.** (1996). Rapid anaerobic benzene degradation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 288–291.

- Marchant, R. ja Banat, I. M.** 2010. The genus *Geobacillus* and hydrocarbon utilization, p. 1888-1894. In K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, vol 3. Berlin Heidelberg. Springer.
- Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C. W., Whyte, L. G.** (2003) Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3085-3092
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., Sanni, G. O.** (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic. Biosyst.* **8**: 10.
- McKew, B. A., Coulon, F., Osborn, A. M., Timmis, K. N., McGenity, T. J.** (2007). Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environ. Microbiol.* **9**: 165–176.
- Merkx, M., Kopp, D. A., Sazinsky, M. H., Blazyk, J. L., Müller, J., Lippard, S. J.** (2001). Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methanemonooxygenase: A tale of two irons and three proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**: 2782–2807.
- Mitt, M.** (2009) Alkaane lagundava bakterikonsortsiumi iseloomustamine Vilsandi rannikumeres. Magistritöö. *Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut*
- Murrell, J. C., Gilbert, B., McDonald, I. R.** (2000). Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch. Microbiol.* **173**: 325-332.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G.** (1993). Profiling complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Nie, Y., Liang, J., Fang, H., Tang, Y., Wu, X.** (2011). Two novel alkane hydroxylase-rubredoxin fusion genes isolated from a *Dietzia* bacterium and the functions of fused rubredoxin domains in long-chain *n*-alkane degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 7279-7288.
- Paavola, M., Olenin, S., Leppäkoski, E.** (2005). Are invasive species most successful in habitats of low native species richness across European brackish water seas? *Est. Coast. Shelf Sci.* **64**: 738–750.
- Palleroni, N. J., Pieper, D. H., Moore, E. R. B.** 2010. Microbiology of hydrocarbon-degrading *Pseudomonas*, p. 1788-1796. In K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, vol 3. Berlin Heidelberg. Springer.
- Pérez-Pantoja, D., Donso, R., Junca, H., González, B., Pieper, D. H.** 2010. Phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics, p. 1356-1391. In K. N. Timmis, T. J. McGenity,

J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, vol 3. Berlin Heidelberg. Springer.

**Pinhassi, J., Zweifel, U. L., Hagström, Å.** (1997). Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microb.* **63**: 3359–3366.

**Prince, R. C., Gramain, A., McGenity, T. J.** 2010. Prokaryotic hydrocarbon degraders, p. 1671–1692. In K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, vol 3. Berlin Heidelberg. Springer.

**Reisfeld, A., Rosenberg, E., Gutnick, D.** (1972). Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. *Appl. Microbiol.* **24**: 363–368.

**Riemann, L., Leitet, C., Pommier, T., Simu, K., Holmfeldt, K., Larsson, U., Hagström, A.** (2008). The native bacterioplankton community in the central Baltic Sea is influenced by freshwater bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 503–515.

**Rizzo, C., Michaud, L., Hörmann, B., Gerce, b., Syldatk, C., Hausmann, R., De Domenico, E., Lo Giudice, A.** (2013). Bacteria associated with sabellids (Polychaeta: Annelida) as a novel source of surface active compounds. *Mar. Poll. Bull.* **70**: 125–133.

**Rajo, F.** (2009) Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.* **11**: 2477–2490

**Rajo, F.** 2010. Enzymes for aerobic degradation for alkanes. p. 781–793. In K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, vol 3. Berlin Heidelberg. Springer.

**Ruskule, A., Kuris, M., Leputē, G., Vetemaa, M., Zableckis, Š.** 2009. Läänemeri. Meie ühine ja kordumatu aare, p. 3–20; 63–71. Balti keskkonnafoorum

**Sabirova, J. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N., Golyshin, P.N.** (2006). Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *J. Bacteriol.* **188**: 3763–3773.

**Sanders, H. L.** (1968). Marine benthic diversity: a comparative study. *Am. Nat.* **102**: 243–282.

**Sazinsky, M. H. ja Lippard, S. J.** (2006). Correlating structure with function in bacterial multicomponent monooxygenases and related diiron proteins. *Acc. Chem. Res.* **39**: 558–566.

**Schneiker, S., Martins dos Santos, V. A., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmeister, J., Chernikov, T. N., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C., Goesmann, A., Golyshina, O. V., Kaminski, F., Khachane, A. N, Lang, S., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Nechitaylo, T., Pühler, A., Regenhardt, D., Rupp, O., Sabirova, J. S., Selbitschka, W., Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Vorhölter, F. J., Weidner, S., Kaiser, O., Golyshin, P.N.**

- (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat. Biotechnol.* **24**: 997–1004.
- Sekine M., Tanikawa S., Omata S., Saito M., Fujisawa T., Tsukatani N., Tajima T., Sekigawa T., Kosugi H., Matsuo Y., Nishiko R., Imamura K., Ito M., Narita H., Tago S., Fujita N., Harayama S.** (2006). Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ. Microbiol.* **8**: 334–346.
- Shanklin, J., Whittle, E., Fox, B. G.** (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochem.* **33**: 12787-12794.
- Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B. G., Münck, E.** (1997). Mössbauer studies of alkane  $\omega$ -hydroxylase: Evidence for a diiron cluster in an integral membrane enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2981-2986.
- Smits, T. H. M., Röthlisberger, M., Witholt, B., van Beilen, J. B.** (1999). Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gramnegative and Grampositive strains. *Environ. Microbiol.* **1**: 307–318.
- Sotsky, J. B., Greer, C. W., Atlas, R. M.** (1994). Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments. *Can. J. Microbiol.* **40**: 981-985.
- de Souza, M. L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. J., Wackett, L. P.** (1998). The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J. Bacteriol.* **180**: 1951–1954.
- Sullivan, J. P., Dickinson, D., Chase, H. A.** (1998). Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO, and their application to bioremediation. *Crit. Rev. Microbiol.* **24**: 335–373.
- Söhngen, N. L.** (1906). Ueber Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Centralbl. Bakt. etc. Abt. II*, **15**: 513-517.
- Söhngen, N. L.** (1913). Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben. *Zentr. Bacteriol. Parasitenk., Abt. II*, **37**: 595-609.
- Teräsväinen, M. J., Pakarinen J. M., Wickström K., Vainitalo P.** (2007). Comparison of the composition of Russian and North Sea crude oils and their eight distillation fractions studied by negative-ion electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: The effect of suppression. *Energy and Fuels.* **21**: 266-273.
- Thangaraj, K., Kapley, A., Purohit, H. J.** (2008). Characterization of diverse *Acinetobacter* isolates for utilization of multiple aromatic compounds. *Bioresour. Technol.* **99**: 2488–2494.



**Throne-Holst, M., Markussen, S., Winnberg, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S.B.** (2006). Utilization of *n*-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 353–360.

**Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Mestre, C., Christine-Olera, J., Ferrero, M., Bosch, R., Mac Cormack, W. P.** (2013). Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils: towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **77**: 22-30.

**van Beilen, J. B., Penninga, D., Witholt, B.** (1992). Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biol. Chem.* **267**: 9194-9201.

**van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G., Chen, Q., Nieboer, M., Witholt, B.** 1996. Effects of two-liquid-phase systems and expression of alk genes on the physiology of alkaneoxidizing strains, p. 35–47. In T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas, and S. Silver (ed.), *Molecular Biology of Pseudomonads*, Washington, DC, USA. American Society for Microbiology Press.

**van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Röthlisberger, M., Witholt, B.** (2001). Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk*-genes. *Microbiol.* **147**: 1621-1630.

**van Beilen, J. B., Smits, T. H. M., Whyte, L. G., Schorcht, S., Röthlisberger, M., Plaggemeier, T., Engesser, K.-H., Witholt, B.** (2002). Alkane hydroxylase homologues in Grampositive strains. *Environ. Microbiol.* **4**: 676-682.

**van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., Witholt, B.** (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil. Gas. Sci. Technol.* **58**: 427-440.

**van Beilen, J. B., Marin, M. M., Smits, T. H., Röthlisberger, Franchini, A. G, M., Witholt, B., Rojo, F.** (2004). Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Environ. Microbiol.* **6**: 264–273.

**van Beilen, J. B. ja Funhoff, E. G.** (2005a). Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 308-314.

**van Beilen, J. B., Smits, T. H. M., Balada, S. B., Roos, F. F., Brunner, T., Witholt, B.** (2005b). Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral-membrane alkane hydroxylases. *J. Bacteriol.* **187**: 85-91.

**van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Rothlisberger, M., Li, Z., Witholt, B.** (2006). Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 59–65.

- van Beilen, J. B. ja Funhoff, E. G.** (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 13-21.
- van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P.** (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 503-549.
- Viggor, S., Juhanson, J., Jõesaar, M., Mitt, M., Truu, J., Vedler, E., Heinaru, A.** (2013). Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiol. Res.* **168**: 415-427.
- Vila, J., Nieto, J. M., Mertens, J., Springael, D., Grifoll, M.** (2010). Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **73**: 349-362.
- Vogel, T. M. ja Grbić-Galić, D.** (1986). Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 200–202.
- Wallar, B. J. ja Lipscomb, J. D.** (1996). Dioxygen activation by enzymes containing binuclear non-heme iron clusters. *Chem. Rev.* **96**: 2625–2658.
- Wang, L., Wang, W., Lai, Q., Shao, Z.** (2010). Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* **12**: 1230–1242.
- Wasmund, K., Burns, K. A., Kurtböke, D. I., Bourne, D. G.** (2009). Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7391–8.
- Watkinson, R. J. ja Morgan, P.** (1990). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation.* **1**: 79-92.
- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., Throne-Holst, M.** (2007). Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 1209-1221.
- Wery, J. ja De Bont, J. A. M.** 2004. Solvent-tolerance of *Pseudomonads*: a new degree of freedom in biocatalysis, p. 609–634. In J. L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*, vol. 3. New York Kluwer/Plenum.
- Whyte, L. G., Schultz, A., van Beilen, J. B., Luz, A. P., Pellizari, D., Labbé, D., Greer, C. W.** (2002). Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **41**: 141-150.
- Witholt, B., de Smet, M.J., Kingma, J., van Beilen, J.B., Kok, M., Lageveen, R.G., Eggink, G.** (1990) Bioconversions of Aliphatic Compounds by *Pseudomonas oleovorans* in Multiphase Bioreactors: Background and Economic Potential. *Trends Biotechnol.* **8**: 46-52.

- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Golyshin, P. N.** (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**: 257–266.
- Yu, Y., Breitbart, M., McNairnie, P., Rohwer, F.** (2006). A web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. *BMC. Bioinformatics.* **7**: 57.
- Zhou, R., Huang, C., Zhang, A., Bell, S. G., Zhou, W., Wong, L. L.** (2011). Crystallization and preliminary X-ray analysis of CYP153C1 from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444. *Acta. Crystallogr. Sect. FStruct. Biol. Cryst. Commun.* **67**: 964–967.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

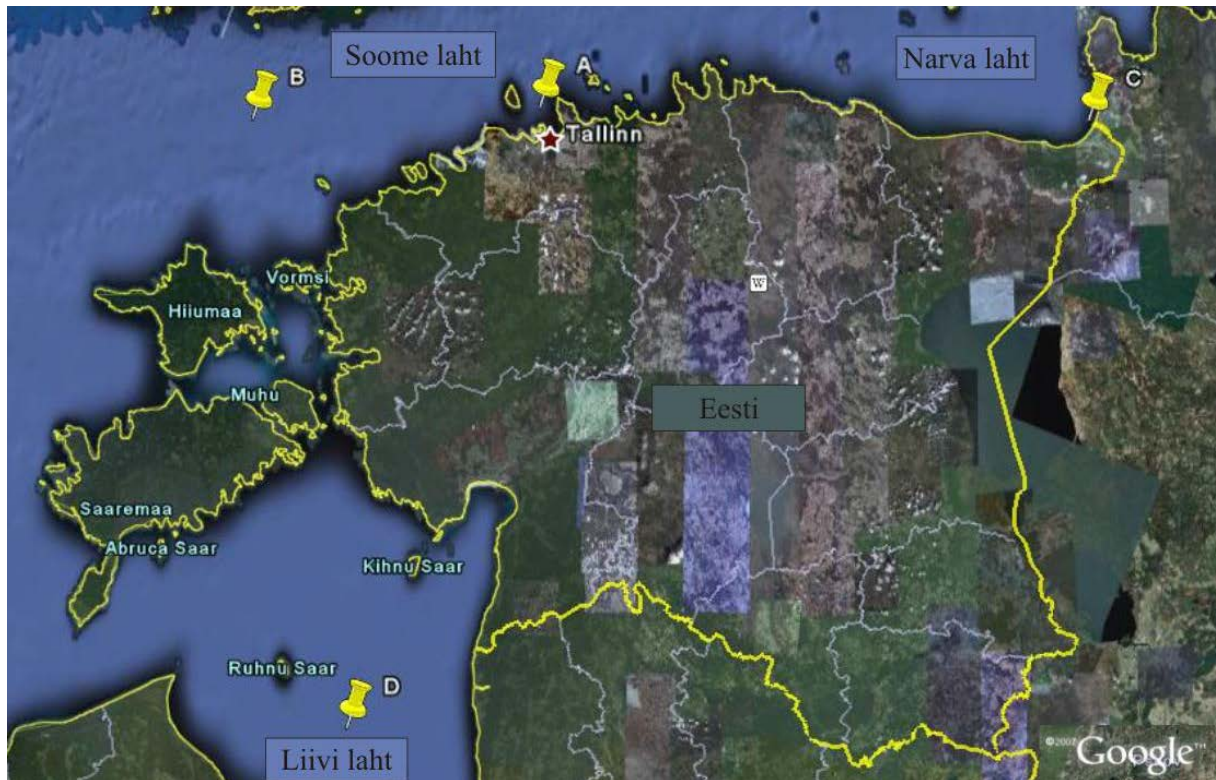
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

[http://fastgroup.sdsu.edu/fg\\_tools.htm](http://fastgroup.sdsu.edu/fg_tools.htm)

<http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>

<http://www.brenda-enzymes.org/>

## Lisa 1



2008. ja 2009. aasta Läänemere proovivõtupunktide A, B, C ja D asukohad (Kiiker, 2010).

## Lisa 2

### *AlkB* klooniraamatukogude analüüs

AlkB homo- loog	Lähim kultiveeritud sugulane BLASTi järgi (GeneBank number)	Identsus ennustatava AlkB aminohappelise järjestuse järgi	E-väärtus	Kokku kloone	2008. aasta proovivõtupunktid				2009. aasta proovivõtupunktid			
					A	B	C	D	A	B	C	D
N18	<i>Rhodococcus</i> sp. US6Ea (KC182633)	100%	2,00E-65	5					2	3		
P88	<i>Rhodococcus</i> sp. H1 (FJ435353)	100%	4,00E-66	2								2
T7	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (AY683535)	100%	8,00E-65	3					2			1
S68	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 22 (EF534131)	100%	1,00E-64	1						1		
D44	<i>Pseudomonas</i> sp. Tn33 (GU226542)	100%	5,00E-64	5			1	4				
D97	<i>Rhodococcus fascians</i> (CAC40958)	100%	7,00E-66	1				1				
S8	<i>Rhodococcus</i> sp. MS272a1 (JN616330)	100%	1,00E-66	1						1		
S24	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (AJ009586)	100%	2,00E-66	2						1	1	
T24	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 (CP003466)	85%	5,00E-58	1					1			
P99	<i>Alcanivorax dieselolei</i> S9-7 (EU853342)	77%	2,00E-50	13			8				3	2
C48	<i>Acetobacteraceae</i> sp. MS302e (JN616337)	77%	1,00E-51	1			1					
CL7	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> vw3-1 (EF534153)	77%	4,00E-48	11			11					
P76	<i>Pedobacter</i> sp. MS245e (JN616323)	75%	8,00E-49	232	46	15	22	39	32	15	6	57
N4	<i>Pedobacter</i> sp. MS245e (JN616323)	72%	7,00E-50	14	1	1	2	4			6	
CL5	<i>Rhodococcus</i> sp. H1 (FJ435353.1)	70%	1,00E-45	1			1					

Lisa 2(järg)												
AlkB	Lähim kultiveeritud sugulane BLASTi järgi	Identsus	E-väärtus	Kokku	2008. aasta				2009. aasta			
homo-		ennustatava AlkB		kloone	proovivõtupunktid				proovivõtupunktid			
loog		aminohappelise										
		järjestuse järgi			A	B	C	D	A	B	C	D
P14	<i>Rhodococcus fascians</i> (CAC40958)	68%	4,00E-47	1								1
N72	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (AY683535)	68%	7,00E-44	3							3	
N77	<i>Acinetobacter venetianus</i> 7-C-1 (EU853417)	67%	8,00E-44	3							3	
D81	<i>Dietzia</i> sp. E1 (FJ744758)	67%	6,00E-38	10	1		3	6				
As51	<i>Roseobacter</i> sp. CCS2 (ZP_01751972)	67%	4,00E-38	1	1							
N41	<i>Gordonia</i> sp. MS121b (JN616298)	66%	2,00E-43	25		3	3		4	2	9	4
N69	<i>Agrobacterium</i> sp. MS189b (JN616308)	65%	8,00E-38	1							1	
T15	<i>Alcanivorax borkumensis</i> S17-15 (EU853370)	64%	6,00E-41	99	5		4		36	16	38	
C322	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 (GQ980251)	63%	5,00E-35	5			5					
CL43	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 (CP003466)	63%	1,00E-39	10			10					
N22	<i>Pseudovibrio</i> sp. FO-BEG1 (CP003147)	60%	2,00E-32	17	8	3			2	1	3	
CL10	<i>Acinetobacter venetianus</i> 7-C-1 (EU853417)	59%	2,00E-34	3			3					
C10	<i>Alcanivorax borkumensis</i> S17-15 (EU853370)	57%	1,00E-35	1			1					
D67	<i>Flavobacteriaceae</i> sp. ALC-1 (ZP_02181409)	54%	2,00E-30	3			1	2				
CL50	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 (CP003466)	54%	4,00E.33	3			3					
Kokku AlkB järjestusega kloone				476	62	22	78	56	77	39	75	67

# LIHTLITSENTS

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Liis Pärnpuu

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 15.03.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
AlkB järjestuste mitmekesisuse võrdlemine Läänemere 2008. ja 2009. aasta *alkB*  
klooniraamatukogude põhjal

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Signe Viggor,  
(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013 (*kuupäev*)